

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση των αιμοπεταλίων, των μονοκυττάρων και της
αντιθρομβίνης στη μελέτη της κινητικής της πήξης του αίματος



ΚΑΡΟΥΛΙΑ ΖΩΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 3978/1

Ημερ. Εισ.: 25-10-2004

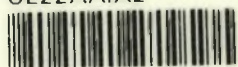
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

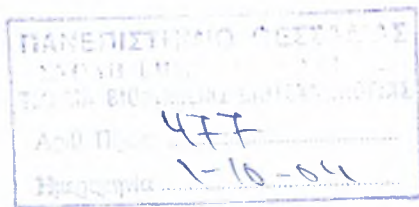
2004

ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075134



ΠΡΟΛΟΓΟΣ:

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης υπό την επίβλεψη του καθηγητή Π. Αρζόγλου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη φιλοξενία στο εργαστήριο, τη βοήθεια, τις χρήσιμες συμβουλές και τις υποδείξεις για την παρακολούθηση του θέματος. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Στέλλα Παράσχου για την πολύτιμη βοήθεια και τις χρήσιμες παρεμβάσεις. Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κύριο Π. Μακρή για την παροχή των δειγμάτων αίματος. Η τριμελής επιτροπή απαρτίζεται από τους κυρίους καθηγητές Αρζόγλου Π., Κουρέτα Δ. και Σταθόπουλο Κ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A) Εισαγωγή.....	6
1. Αιμόσταση.....	7
Πρωτογενείς παράγοντες.....	9
Κατάταξη παραγόντων της πήξης.....	9
2. Η εξέλιξη της αιμόστασης.....	10
3. Επισκόπηση των παραγόντων της πήξης.....	12
i) προθρομβίνη (FII)\ θρομβίνη (FIIa).	13
βιοχημεία της θρομβίνης.....	14
ii) προκομβερτίνη (FVII).....	15
iii) ιστικός παράγοντας, ΙΠ (TissueFactor).....	16
4. Ο μηχανισμός της πήξης.....	17
i) ο ρόλος της θρομβίνης στην πήξη.....	20
ii) ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην πήξη.....	20
iii) ο ρόλος του ασβεστίου στην πήξη.....	21
iv) ο ρόλος των μονοκυττάρων.....	22
5. Αναστολείς της πήξης.....	23
B) Πειραματικό μέρος.....	24
B)1. Αντιδραστήρια-Υλικά.....	24
Ρυθμιστικό διάλυμα ανασύστασης παραγόντων (Buffer A).....	24
Βιολογικά υλικά.....	25
Βιοχημικά υλικά.....	25
Όργανα.....	25
B)2. Τεχνικές-Μέθοδοι.....	25
2.1. Ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες παρουσία SDS (SDS- PAGE).....	27
2.2. Διαλύματα για SDS ηλεκτροφόρηση και δημιουργία της πηκτής.....	29
Ο ρόλος των συστατικών.....	30
Προετοιμασία πριν την εισαγωγή των δειγμάτων	

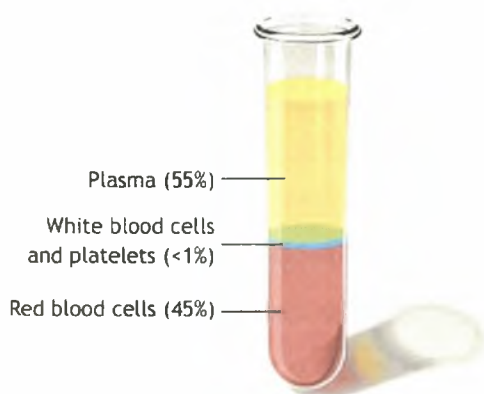
στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.....	30
2.3. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή	
SDS στη μεμβράνη.....	31
2.4. Τεχνική Western Blotting και διαλύματα απαραίτητα	
για αυτή.....	32
B)3. Προετοιμασία των βιολογικών υλικών.....	35
B)4. Βελτιστοποίηση της μεθόδου in vitro.....	38
i) κινητική της ενεργοποίησης του δρόμου του ιστικού παράγοντα (TF) από PPP σε διαφορετικούς χρόνους.....	38
ii) επίδραση θρόμβου στην ενεργοποίηση του δρόμου του ιστικού παράγοντα απουσία παράγοντα IX (DIX).....	38
α) παρουσία και απουσία παράγοντα VIIa σε διαφορετικούς χρόνους.....	38
β) παρουσία και απουσία θρομβοπλαστίνης (TP) και παρουσία ή απουσία FVIIa σε διαφορετικούς χρόνους.....	39
γ) παρουσία FVIIa και παρουσία ή απουσία θρομβοπλαστίνης (TP) σε διαφορετικούς χρόνους.....	40
δ) παρουσία FVIIa και αιμοπεταλίων , παρουσία μόνο FVIIa παρουσία μόνο αιμοπεταλίων σε διαφορετικούς χρόνους.....	41
iii) σύγκριση πλάσματος φτωχού και πλούσιου σε αιμοπετάλια στην ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου.....	42
α) παρουσία και απουσία FVIIa σε διαφορετικούς χρόνους.....	42
β) παρουσία και απουσία FVIIa σε μικρότερους διαφορετικούς χρόνους.....	43
γ) παρουσία και απουσία FVIIa σε διαφορετικές αναλογίες PPP και PRP.....	44
δ) διαφορετικές συγκεντρώσεις PPP και PRP σε διαφορετικούς χρόνους.....	45
ε) κινητική PPP και PRP.....	46
στ) κινητική PPP και PRP σε μεγαλύτερους διαφορετικούς χρόνους.....	46
ζ) διαφορετικές συγκεντρώσεις αιμοπεταλίων στον ίδιο χρόνο.....	47

iv) ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου παρουσία μονοκυττάρων και παρουσία FVIIa.....	48
α) σε PPP και διαφορετικές ποσότητες FVIIa σε διαφορετικούς χρόνους.....	48
β) σε PPP και FVIIa σε διαφορετικούς χρόνους και σε PPP και PRP σε διαφορετικούς χρόνους απουσία FVIIa.....	49
v) ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου παρουσία μονοκυττάρων και αντιθρομβίνης.....	49
vi) επίδραση της μαστίχας Χίου στην ενεργοποίηση του δρόμου του ιστικού παράγοντα σε PPP.....	50
Γ) Αποτελέσματα.....	51
i) κινητική της ενεργοποίησης του δρόμου του ιστικού παράγοντα (TF) από PPP σε διαφορετικούς χρόνους.....	52
ii) επίδραση θρόμβου στην ενεργοποίηση του δρόμου του ιστικού παράγοντα απουσία παράγοντα IX (DIX)	52
iii) σύγκριση πλάσματος φτωχού και πλούσιου σε αιμοπετάλια στην ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου.....	54
iv) ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου παρουσία μονοκυττάρων και παρουσία FVIIa.....	56
v) ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου παρουσία μονοκυττάρων και αντιθρομβίνης.....	57
vi) επίδραση της μαστίχας Χίου στην ενεργοποίηση του δρόμου του ιστικού παράγοντα σε PPP.....	57
Δ) Συζήτηση.....	58
Ε)Περίληψη.....	61
ΣΤ)Βιβλιογραφία.....	62

A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η έννοια της ζωής στους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με ένα οργανωμένο σύστημα μεταφοράς που καλείται κυκλοφορικό και συμβάλλει σημαντικά στην ομοιόσταση. Σχετίζεται με λειτουργίες του οργανισμού, όπως την προμήθεια των κυττάρων με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα, των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού και άλλων κυτταρικών εκκριμάτων, τη μεταφορά ουσιών, όπως ορμονών, και την κατανομή του νερού, των διαλυμένων ουσιών και της θερμοκρασίας. Στο κυκλοφορικό σύστημα συμπεριλαμβάνονται το αίμα και το καρδιαγγειακό σύστημα που αποτελείται από ένα δίκτυο αγωγών και μία αντλία, την καρδιά, για την κυκλοφορία του αίματος.

Το αίμα είναι ένα ελαιώδες υγρό από ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια και λευκά αιμοσφαίρια σε ένα σύνθετο διάλυμα, το πλάσμα. Τα λευκά αιμοσφαίρια αποτελούνται από τα κοκκώδη λευκοκύτταρα στα οποία ανήκουν τα ουδετερόφιλα, τα βασίφιλα και τα εωσινόφιλα και από τα άκωκα λευκοκύτταρα στα οποία περιέχονται τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα. Το πλάσμα αποτελεί περίπου το 55% του αίματος, περιέχει αέρια, άλατα, πρωτεΐνες, λιπίδια και υδρογονάνθρακες και αποτελείται κατά 93% από νερό. Ο διαχωρισμός των συστατικών του αίματος γίνεται με φυγοκέντρηση (εικόνα 1). Το σύνολο σχεδόν της μάζας των διαλυμένων συστατικών αποτελείται από



ADAM.

πρωτεΐνες (70 g/l), αλλά επειδή το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών είναι μεγάλο, η μοριακή τους συγκέντρωση είναι μικρή (1 mmol περίπου) (Μακρής Π., 2001).

εικόνα 1: φυγοκέντρηση αίματος

Η προσπάθεια για αποφυγή της απώλειας του αίματος και διατήρηση του σε υγρή μορφή οδήγησε στην εξέλιξη του μηχανισμού της αιμόστασης. Είναι ένας φυσιολογικός τρόπος άμυνας του οργανισμού που κατορθώνει να

αναστέλλει την αιμορραγία των αιμοφόρων αγγείων από βλάβες και να εξασφαλίζει την ομαλή λειτουργία σ' αυτά. Η ανεπάρκεια του μηχανισμού εκφράζεται κλινικά με τα αιμορραγικά σύνδρομα που αργά ή γρήγορα εκδηλώνονται σε κάθε τραυματισμό (πίνακας 1, Page et al,1997). Η εκτροπή του μηχανισμού προς την ενδοαγγειακή πυροδότησή του οδηγεί κλινικά σε θρόμβωση (τοπικό φαινόμενο) ή σε διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (γενικευμένο φαινόμενο).

Στην σύνθετη διαδικασία της πήξης συμμετέχουν το τοίχωμα του αγγείου, τα αιμοπετάλια, οι παράγοντες πήξης, οι αναστολείς των παραγόντων πήξης και οι αναστολείς της ινωδόλυσης.

Αιμορραγικές διαταραχές	
Κληρονομικές	
Αιμορροφιλία Α (έλλειψη παράγοντα VIII)	
Αιμορροφιλία Β (έλλειψη παράγοντα IX)	
Νόσος von Willebrand	
Αιμοπεταλιακές διαταραχές (π.χ. θρομβασθένεια Glanzmann)	
Επίκτητες	
Έλλειψη βιταμίνης Κ	
Ηπατική νόσος	
Διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη	
Θρομβοκυττοπενία (αυτοάνοση λοίμωξη, σπληνομεγαλία)	
Αιμοπεταλιακή διαταραχή (ουραιμία)	

πίνακας 1: αιμορραγικές διαταραχές

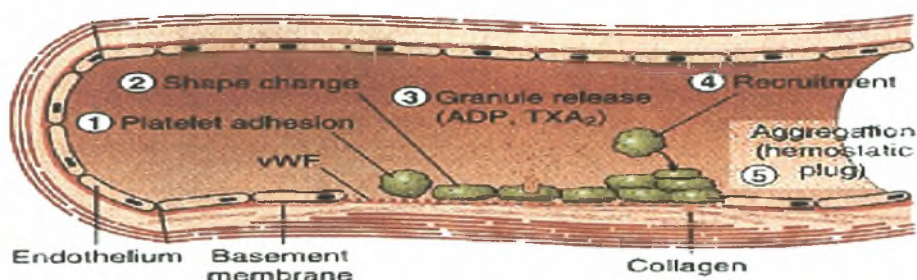
A) 1. ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

Η επιβίωση των διαφόρων οργανισμών είναι πλήρως εξαρτημένη από τη λειτουργική αποτελεσματικότητα της αιμόστασης. Διακρίνονται ορισμένα στάδια αιμόστασης (Μπέης Ις. et al, 2000), όπου τονίζεται η συμμετοχή τριών βασικών βιολογικών συνιστωσών.

α) Η αρχική αιμόσταση (εικόνα 2). Περιλαμβάνει τη σύσπαση του αγγείου στο σημείο της βλάβης και την συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Η αγγειοσύσπαση είναι το πρώτο βήμα-απάντηση στην παρουσία αγγειοσυσπαστικών αμινών, που είτε εκλύονται στο σημείο αυτό από τα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ή από τα παρευρισκόμενα ή προσερχόμενα με την

κυκλοφορία αιμοπετάλια (όπως η σερετονίνη) είτε προσφέρονται με την κυκλοφορία (όπως η αδρεναλίνη). Η σύσπαση εξαναγκάζει τα χείλη του τραύματος να προσεγγίσουν και διευκολύνει την επίσχεση της αιμορραγίας. Η απάντηση των αιμοπεταλίων στο ερέθισμα, που προέρχεται από την επαφή με το τραύμα είναι η λειτουργική έκφραση της συμπεριφοράς τους, καθώς αυτά προστρέχουν στο σημείο της βλάβης πριν από όλα τα κυτταρικά στοιχεία ενεργοποιούμενα κυρίως από το απογυμνωμένο (απενδοθηλιωμένο) τοίχωμα των αγγείων και συμβάλλουν αποφασιστικά στην αντιμετώπιση της αιμορραγίας.

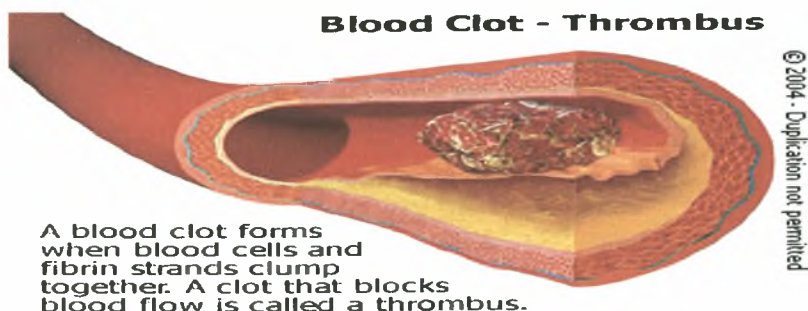
B. PRIMARY HEMOSTASIS



εικόνα 2: αρχική αιμόσταση

β) Η πήξη του αίματος. Το δεύτερο βήμα ενεργοποίησης της αιμόστασης αποτελεί το σύνολο της αλληλοδιάδοξης ενεργοποίησης των πρωτεϊνών του πλάσματος (παραγόντων πήξης, πίνακες 2 και 3), οι οποίες με το σχηματισμό των τριών κυρίων ενζυμικών συμπλεγμάτων (δεκάση I και II και προθρομβινάση) οδηγούν στην παραγωγή θρομβίνης και στο σχηματισμό ινικής (του ερυθρού θρόμβου, εικόνα 3), η οποία αποφράσσοντας το άνοιγμα βλάβης του αγγείου οδηγεί σε μόνιμη επίσχεση της αιμορραγίας.

Blood Clot - Thrombus



εικόνα 3: θρόμβος

Η πήξη του αίματος δεν οδηγεί σε γενικευμένη διαταραχή, γιατί ως ενιαίο φαινόμενο αυτοελέγχεται από την παρουσία των φυσιολογικών

ανασταλτών της που εμποδίζουν τη γενίκευση της πυροδότησής της από τον αυτοκαταλυτικό ρόλο της θρομβίνης.

γ) Η ινωδόλυση. Το τελευταίο βήμα της αιμόστασης, οδηγεί στην αποκατάσταση των βλαβών, λύνοντας το θρόμβο και ομαλοποιώντας το ενδοθηλιακό τοίχωμα των αγγείων με την παραγωγή του κύριου ενζύμου της, της πλασμίνης. Η πλασμίνη σχηματίζεται είτε τοπικά με την απελευθέρωση ιστικών ενεργοποιητών του πλασμινογόνου από τα τραυματισμένα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε από ενδογενείς παράγοντες (όπως από τον παράγοντα XII της πήξης που σχηματίζεται τοπικά πάνω στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και δρα επίσης στο πλασμινογόνο, ή από την ουροκινάση που προσέρχεται με την κυκλοφορία). Η ινωδόλυση είναι και αυτή φαινόμενο που ελέγχεται από την παρουσία των φυσιολογικών ανασταλτών της.

Προκαλλικρεΐνη (fletcher factor), ενδογενής πορεία πήξης	
I	(ινωδογόνο), κοινή πορεία πήξης
II	(προθρομβίνη), κοινή πορεία πήξης
III	(ιστικός παράγοντας), εξωγενής πορεία πήξης
IV	(ασβέστιο), κοινή πορεία πήξης
V	(proaccelerin),(συμπαράγοντας πρωτεΐνης), κοινή πορεία πήξης
VI	(Va) (accelerin)
VII	(προκομβερτίνη), (ενδοπεπτιδάση), εξωγενής πορεία πήξης
VIII	(αντιαιμοροφιλικός παράγοντας A) (συμπαράγοντας πρωτεΐνης), ενδογενής πορεία πήξης
IX	(Christmas factor), αντί-αιμοροφιλικός παράγοντας, ενδογενής πορεία πήξης
X	(stuart factor), ενδοπεπτιδάση, κοινή πορεία πήξης
XI	(plasma thromboplastin antecedent, PTA), ενδοπεπτιδάση, ενδογενής πορεία πήξης
XII	(Hageman factor), ενδοπεπτιδάση, ενδογενής πορεία πήξης
XIII	(σταθεροποιός της ινικής), τρανσπεπτιδάση, κοινή πορεία πήξης

Πίνακας 2: Πρωτογενείς παράγοντες και πορεία πήξης τους

Ζυμογόνα σερινικών πρωτεασών :

παράγοντας XII: συνδέεται με το εκτεθειμένο τραύμα, ενεργοποιείται από μεγάλο μοριακού βάρους κινινογόνο και καλλικρεΐνη

παράγοντας XI: ενεργοποιείται από τον παράγοντα XIIa παράγοντας IX: ενεργοποιείται από τον παράγοντα XIa παρουσία Ca^{++}

παράγοντας VII: ενεργοποιείται από θρομβίνη παρουσία Ca^{++} παράγοντας X: ενεργοποιείται στην επιφάνεια ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων από το σύμπλεγμα δεκάσης και από τον παράγοντα VIIa παρουσία ιστικού παράγοντα και Ca^{++} παράγοντας II: ενεργοποιείται στην επιφάνεια ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων από το σύμπλεγμα της προθρομβινάσης

Συμπαράγοντες :

παράγοντας VIII: ενεργοποιείται από την θρομβίνη, είναι συμπαράγοντας στην ενεργοποίηση του παράγοντα X από τον παράγοντα IXa

παράγοντας V: ενεργοποιείται από την θρομβίνη, είναι συμπαράγοντας στην ενεργοποίηση της προθρομβίνης από τον παράγοντα Xa

Tissue factor: συμπαράγοντας για τον παράγοντα VII

Ινωδογόνο :

παράγοντας I: συγκολλείται με την επίδραση της θρομβίνης για τον σχηματισμό θρόμβου ινώδους

Τρανσγλουταμινάση :

παράγοντας XIII: ενεργοποιείται από θρομβίνη παρουσία Ca^{++} . Σταθεροποιεί τον θρόμβο σχηματίζοντας διασυνδέσεις μεταξύ μορίων ινώδους

Ρυθμιστές και άλλες πρωτεΐνες :

παράγοντας Von Willebrand: συνδέεται με το ενδοθήλιο και λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ αιμοπεταλίων -IX- κολλαγόνου

πρωτεΐνη C: ενεργοποιείται σε ενεργή πρωτεΐνη C από την θρομβίνη και συνδέεται με την θρομβοντουλίνη. Στη συνέχεια καταστρέφει τους παράγοντες VIIIa και Va

πρωτεΐνη S: είναι συμπαράγοντας της πρωτεΐνης S

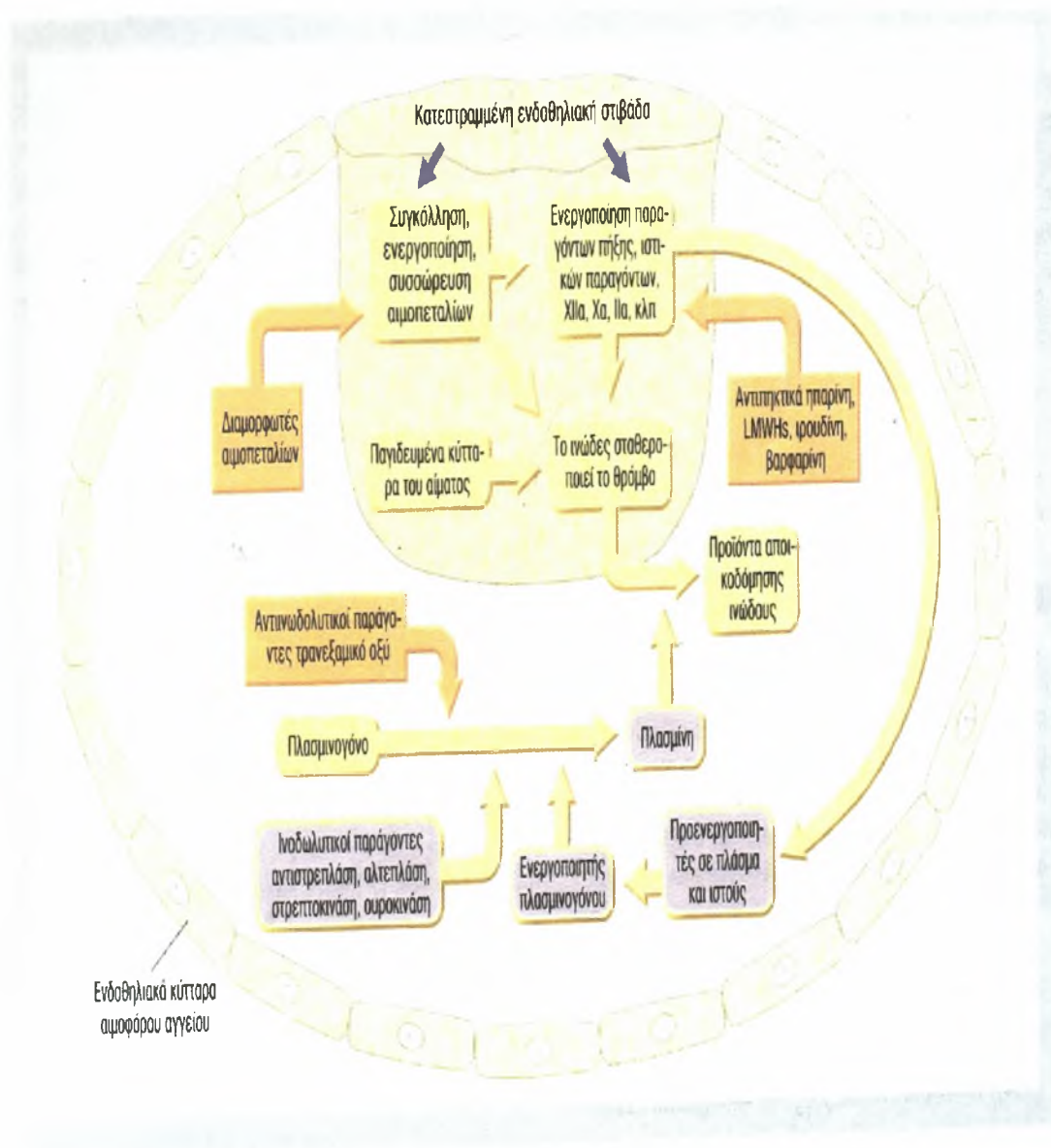
αντιθρομβίνη III: ο σημαντικότερος αναστολέας της πήξης, ελέγχει την δράση της θρομβίνης και των παραγόντων IXa, Xa, XIa, XIIa

Πίνακας 3: Κατάταξη των παραγόντων της πήξης

A) 2. Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ

Απομονώνοντας τα βήματα της αιμόστασης, μπορεί να υποθεθεί ότι αλληλοαναιρούνται. Σε φυσιολογικές συνθήκες και στην πράξη όμως δεν συμβαίνει αυτό, διότι υπάρχει ισορροπία στο συνολικό φαινόμενο της αιμόστασης και σε κάθε βήμα της. Το κάθε βήμα έχει διαφορετική κινητική, ώστε με τους διάφορους ρυθμούς της αιμόστασης να εξασφαλίζεται η επίσχεση της αιμορραγίας από την ταχύτητα των αρχικών σταδίων, αλλά και η λύση του θρόμβου χάρη στο αργό (κινητικά) φαινόμενο της ινωδόλυσης.

Υπάρχει μία συνολικά χρονοεξαρτημένη εξέλιξη της αιμόστασης καθώς η αρχική αιμόσταση ξεκινά τα πρώτα min μετά τον τραυματισμό και ολοκληρώνεται σε διάστημα 3-4 min, η πήξη απαιτεί για την ολοκλήρωσή της τα επόμενα 4-5 min και η ινωδύλωση αρχίζει τουλάχιστον 1-3 ώρες αργότερα και ολοκληρώνεται σε διάστημα μέχρι 72 ωρών (Monroe D.M. et al, 2002).



εικόνα 4: ο σχηματισμός θρόμβου σε αιμοφόρο αγγείο

Η διεργασία διαιρείται σε πρωτογενή και σε δευτερογενή φάση και ενεργοποιείται όταν διακοπεί η συνέχεια του επιθηλίου των αγγείων και το αίμα εκτεθεί στον υπενδοθηλιακό συνδετικό ιστό (εικόνα 4, Page et al, 1997).

Κατά την πρωτογενή αιμόσταση παρατηρείται στις θέσεις τραυματισμού ο σχηματισμός βύσματος από τα αιμοπετάλια. Είναι πρωταρχικής σημασίας για τον τερματισμό της απώλειας αίματος από τα τριχοειδή, τα μικρά αρτηρίδια και τα φλεβίδια. Η δευτερογενής αιμόσταση περιλαμβάνει τις αντιδράσεις του συστήματος πήξης του πλάσματος που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ινώδους. Τα ινίδια του ινώδους που παράγονται ενισχύουν τα αρχικά αιμοστατικά πήγματα, μια αντίδραση ιδιαίτερα σημαντική στα μεγαλύτερα αγγεία, που εμποδίζει την επανάληψη της αιμορραγίας ώρες ή ημέρες μετά τον αρχικό τραυματισμό.

Αν και παρουσιάζονται σαν διαφορετικά γεγονότα, η πρωτογενής και η δευτερογενής αιμόσταση συνδέονται στενά μεταξύ τους. Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια επιταχύνουν την πήξη του πλάσματος και προϊόντα της πήξης του πλάσματος, όπως η θρομβίνη, διεγείρουν τη συσώρευση των αιμοπεταλίων.

A) 3. ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ

Οι παράγοντες της αιμόστασης διακρίνονται ανάλογα με το σημείο που εκδηλώνουν την κύρια δράση τους, σε παράγοντες αρχικής αιμόστασης, πήξης και ινωδογόνου και ανάλογα με την ποιότητα δράσης τους σε παράγοντες όδευσης και αναστολείς (Μπέης Ις. et al, 2000). Οι παράγοντες όδευσης είναι οι πρωτεΐνες του πλάσματος και είναι οι παρακάτω: ο ιστικός παράγοντας, οι εξαρτημένοι από τη βιταμίνη Κ παράγοντες, όπως η θρομβίνη ή FII, η προκομβερτίνη ή FVII, ο παράγοντας Christmas ή FIX και ο παράγοντας Stuart ή FX, οι παράγοντες-υπόστρωμα στη δράση της θρομβίνης, όπως το ινωδογόνο ή η προαξελίνη ή ο αντισταμοφιλικός ή FV και ο σταθεροποιός της ινικής ή FXIII και οι παράγοντες επαφής, όπως ο παράγοντας XI, ο παράγοντας Hageman ή FXII, η προκαλλικρεΐνη ή ΠΚ και το μεγάλο μοριακού βάρους κινινογόνο MMBK, όπως αναφέρονται και στους πίνακες 2 και 3. Στον πίνακα 4 αναφέρονται οι πρωτογενείς παράγοντες πήξης, τα μοριακά βάρη τους και η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα. Στο πλάσμα κυκλοφορούν και αναστολείς της πήξης που διακρίνονται σε τρεις ομάδες, τις σερπίνες όπου ανήκουν η αντιθρομβίνη III, η αντιθρομβίνη II ή συμπαράγοντας II της ηπαρίνης ή Hc-II, η A₂ –μακροσφαιρίνη, η A₂ –

αντιπλασμίνη, η αντιθρυψίνη, το σύστημα της πρωτεΐνης C και τέλος οι αναστολείς του εξωγενούς δρόμου ενεργοποίησής της (Gerotziafas G.T., 1998). Παρακάτω ακολουθεί περιγραφή κάποιων σημαντικών παραγόντων στον μηχανισμό της αιμόστασης.

Major Coagulation Factors			
Roman Numeral	Common Name	Molecular Weight (kDa)	Plasma Concentration (nM)
I	Fibrinogen	340	8820
II	Prothrombin	72	1390
IIa	Thrombin	32	N/A
III	Tissue Factor	45	N/A
IV	Calcium Ions	0.040	1200
V	Proaccelerin	330	20
VII	Proconvertin	50	10
VIII	Antihemophilic Factor	330	0.3
IX	Christmas Factor	57	90
X	Stuart Factor	56	180
XI	Plasma Thromboplastin Antecedent	125	40
XII	Hageman Factor	76	450
XIII	Fibrin Stabilizing Factor	320	30
	Von Willebrand Factor	~1200	Variable

πίνακας 4: πρωτογενείς παράγοντες πήξης

ι) ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗ (FII) \ ΘΡΟΜΒΙΝΗ (FIIa)

Η αποτελεσματικότητα της πήξης είναι συνάρτηση της ταχύτητας σχηματισμού της θρομβίνης. Κάθε βλάβη στη διαδοχή ενζυμικών αντιδράσεων που προηγούνται (έλλειψη ενός ή περισσότερων παραγόντων της πήξης, παρουσία ενός αναστολέα) έχει ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια της αιμοστατικής λειτουργίας. Ο κύριος ρυθμιστικός παράγοντας της κινητικής αυτής του σχηματισμού της θρομβίνης είναι το ένζυμο θρομβίνη που λειτουργεί με θετικό και αρνητικό μηχανισμό και αποτελεί ένα ιδανικό πρότυπο αυτοελεγχόμενου ενζύμου. Η θρομβίνη ενεργοποιώντας τους παράγοντες VIII και V συμμετέχει αποφασιστικά στον ταχύτατο σχηματισμό προθρομβινάσης. Όμως η θρομβίνη δεν καθορίζει ρυθμιστικά μόνο την ενεργοποίησή της, αλλά και την αδρανοποίησή της (Ruf W. et al 2003). Παράλληλα η θρομβίνη μπορεί να δράσει πρωτεολυτικά και στο ίδιο το μόριο της προθρομβίνης διασπώντας το σε σημείο διαφορετικό από εκείνο όπου παράγει τη θρομβίνη. Καθώς με τον τρόπο αυτό δεν παράγεται

θρομβίνη, η διαθέσιμη ποσότητα θρομβίνης ελαττώνεται (Gerotziakas G.T. et al, 2002).

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ

Παράγεται στα ηπατικά κύτταρα, ενώ στη διάρκεια της ενδοκυττάριας πρωτεϊνικής σύνθεσής της μετατρέπεται σε ώριμο και δραστικό παράγοντα με την παρουσία της βιταμίνης Κ. Η συγκέντρωσή της στο πλάσμα είναι περίπου 100 μg/ml και η ημιδιάρκεια ζωής της 100 h με 5 ημέρες. Η θρομβίνη (εικόνα 5) αποτελείται από μια απλή γλυκοπρωτεϊνική αλυσίδα με 70 kDa MB, η οποία υδρολύεται από τον FXa και μετατρέπεται σε θρομβίνη (την ενεργό δηλαδή μορφή της προθρομβίνης, FIIa). Η πρωτοταγής δομή του ζυμογόνου είναι πλήρως γνωστή. Το μόριο της αποτελείται από 582 υπόλοιπα αμινοξέων και τρεις ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες. Η δομή του μορίου συνιστάται σε τέσσερις περιοχές: την Gla περιοχή προς το N-τελικό άκρο, δύο περιοχές με δομή kringle και την καταλυτική περιοχή.



εικόνα 5: θρομβίνη

Κατά άλλους αποτελείται από δύο μισά, ένα προ-μισό και ένα θρόμβινο-παράγωγο. Το προ-μισό βρίσκεται στο N –τελικό άκρο του μορίου της προθρομβίνης, έχει περίπου 35,5 kDa MB και πρακτικά αποτελεί την Gla-περιοχή, όπου βρίσκεται και το τμήμα που καλείται F₁F₂- κλάσμα της προθρομβίνης. Το προ-μισό διαιρείται αυθαίρετα σε δύο τμήματα από τα οποία το ένα αποτελείται από την Gla-περιοχή, ενώ το δεύτερο περιέχει δύο μικρότερα (με ομόλογη δομή και MB 21 και 120 k Da). Η παρουσία ενός δισουλφιδικού δεσμού προσδίδει στα ομόλογα αυτά τμήματα όψη τριπλής αναδίπλωσης (δομή kringle). Το θρομβινό-παράγωγο τμήμα του μορίου της

προθρομβίνης βρίσκεται στο C-τελικό του άκρο αποτελείται από την καταλυτική περιοχή και έχει 37,5 kDa MB (Vincenot A. et al, 1997).

Η προθρομβίνη με τη βοήθεια της Gla-περιοχής της συνδέεται με ιόντα Ca και στη συνέχεια με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια των μεμβρανών, όπου και υφίσταται την υδρόλυση του δεσμού Arg-273/Thr-274 από την οποία σχηματίζεται η προθρομβίνη-2. Ένα δεύτερο κόψιμο αυτής στο δεσμό Arg-323/Ile-324 διαχωρίζει την α από την β αλυσίδα της ώριμης και δραστικής θρομβίνης. Η δραστική θρομβίνη αντιστοιχεί στην α-θρομβίνη, η οποία διαχωρίζεται από το F1-2 κλάσμα της προθρομβίνης. Η α-θρομβίνη αποτελείται από δύο αλυσίδες συνδεδεμένες με δισουλφιδικό δεσμό. Η α θρομβίνη στη συνέχεια μπορεί να υδρολυθεί σε λιγότερα δραστικά ένζυμα όπως η β και η γ θρομβίνη. Αυτοί οι τύποι θρομβίνης διατηρούν την ικανότητα να διασπούν μικρά συνθετικά χρωμογόνα τριπεπτίδια ίσως και παράγοντες, όπως ο XIII και η προθρομβίνη. Έχει όμως ελαττωθεί σημαντικά η ικανότητα να διασπά το ινωδογόνο, τη θρομβοπλασίνη ή την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (Μακρής Π. 2001).

ii) ΠΡΟΚΟΜΒΕΡΤΙΝΗ (FVII)

Η χορήγηση προκομβερτίνης σε ασθενείς πετυχαίνει την διακοπή της αιμορραγίας χωρίς να παρατηρούνται φαινόμενα θρομβώσεων, λόγω της ιδιότητας του VIIa να δρα μόνο στην περιοχή που υπάρχει αιμορραγία. Είναι απλή πολυπεπτιδική ένωση με 60 kDa MB που ενεργοποιείται από την παρουσία του ιστικού παράγοντα και μετατρέπεται σε μία ένωση με δύο αλυσίδες αποκαλύπτοντας τη σερίνη του ενεργού της κέντρου. Είναι ο δρων ενζυμικός παράγοντας της δεκάσης I, ενώ η συγκέντρωσή της στο πλάσμα είναι 1 µg/ml και η ημιδιάρκεια ζωής 4 h (Gerotziakas G.T. et al, 2004).

Η δομή του παράγοντα VII είναι σχεδόν ταυτόσημη με αυτήν των άλλων βιταμινω-Κ εξαρτημένων παραγόντων της πήξης. Αποτελείται από τέσσερις περιοχές, μία Gla περιοχή με 10 γ-καρβόξυ-γλουταμινικά οξέα για τη σύνδεση του μορίου με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της μεμβράνης. Δύο περιοχές EGF υπάρχουν στην ελαφριά αλυσίδα, ενώ η καταλυτική περιοχή περιλαμβάνεται στη βαριά αλυσίδα και προς το C τελικό άκρο του μορίου (Gerotziakas G.T. et al, 1999). Ο παράγοντας VII

ενεργοποιείται πρωτεολυτικά και μετατρέπεται σε σερινική πρωτεάση, Arg-152/Ile-153 προς την πλευρά του C τελικού άκρου του. Παράγει ένα νέο δραστικό μόριο, του οποίου η ελαφριά αλυσίδα βρίσκεται προς την πλευρά του N τελικού άκρου και έχει MB 20 kDa. Η βαριά αλυσίδα προς την πλευρά του C τελικού άκρου περιέχει την καταλυτική περιοχή με 30 kDa MB, συνδεδεμένη με δισουλφιδικό δεσμό. Η μορφή αυτή του VII συνδέεται με τον ιστικό παράγοντα (ΙΠ), τα ιόντα ασβεστίου και τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια και σχηματίζει την εξωγενή δεκάση (Butenas S. et al, 2003).

Κάθε βλάβη, φυσική ή χημική που καταστρέφει το ενδοθήλιο καθιστά τον ΙΠ διαθέσιμο στο διερχόμενο ρεύμα (έρχεται σε επαφή με τους υπενδοθηλιακούς ιστούς) και οδηγεί ύστερα από ταχύτατη αλληλεπίδραση των παραγόντων στο σχηματισμό του συμπλέγματος FVIIa/ΙΠ που ενεργοποιεί καταλυτικά τον FX, που με τη σειρά του ενεργοποιεί τον FVII σε FVIIa οδηγώντας σε μία αύξηση της πηκτικής δραστηριότητας κατά 100 φορές (Monroe et al, 2001).

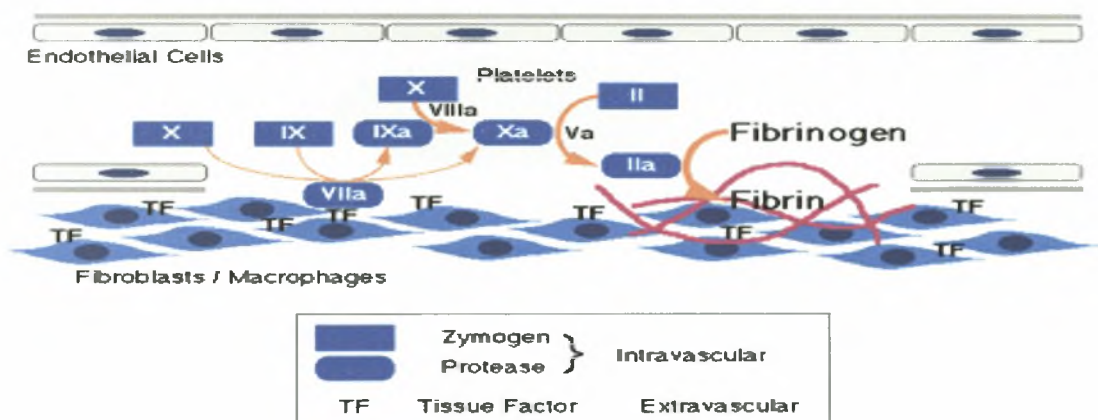
iii) ΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ, ΙΠ (TISSUE FACTOR, TF)

Ο παράγοντας ΙΠ είναι μία θερμοευαίσθητη και υδρόφοβη γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε υδατάνθρακες που αποτελείται από φωσφολιπίδια και αποπρωτεΐνη Ι. Το μόριο του σχηματίζεται από μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα με 44 kDa MB περίπου που διακρίνεται σε τρεις περιοχές, μια εξωκυττάρια, μια διαμεμβράνια και μια ενδοκυττάρια. Ο ΙΠ (εικόνα 6) λειτουργεί ως υποδοχέας της μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων για τον FVII και FVIIa. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ή στην πλασματική επιφάνεια της μεμβράνης αρκετών κυττάρων, τα οποία φυσιολογικά δεν έρχονται σε επαφή με το πλάσμα και δεν τον εκθέτουν άμεσα στη ροή του αίματος, όπως τα μονοκύτταρα. Το φυσιολογικό αγγειακό ενδοθήλιο δεν παρουσιάζει δραστηριότητα ΙΠ, την εκφράζει όμως και συνθέτει ΙΠ ύστερα από βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μονοκυττάρων (Giesen P.L.A. et al, 1999).

Το μόριο του με τα 263 αμινοξέα σχηματίζει τρεις διακριτές περιοχές, μια βραχεία κυτταροπλασματική (διαθέτει 21 αμινοξέα και μια κυστεΐνη μεταξύ τους στο C τελικό άκρο και συνδέεται με δισουλφιδικό δεσμό προς την

εξωκυττάρια), μια περιοχή της μεμβράνης αποτελούμενη από 23 ιδιαίτερα υδρόφοβα αμινοξέα και μια εξωκυττάρια περιοχή αποτελούμενη από 219 αμινοξέα (στην περιοχή αυτή υπάρχει πλευρά σύνδεσης με τον FVII) (Giesen P.L.A. et al, 1999).

Ο παράγοντας VII έχει προπηκτική δραστηριότητα που σε φυσιολογικές συνθήκες δεν εκδηλώνεται εξαιτίας της παρουσίας ενός φυσικού φραγμού που τον χωρίζει από τον ΙΠ. Ενεργοποίηση της πήξης απλά σημαίνει διακοπή του φραγμού αυτού. Επομένως, η βλάβη του τοιχώματος των αγγείων από μόνη της είναι ικανή να πυροδοτεί την ενεργοποίηση της πήξης, γεγονός που δεν παρατηρείται σε περιπτώσεις απουσίας ΙΠ (Gerotziafas G.T. et al, 2003). Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι ο ΙΠ δρώντας ως συμπαράγοντας έχει συμπεριφορά μοναδική μεταξύ των άλλων συμπαραγόντων, γιατί δεν απαιτεί άλλες διαδικασίες για τη δραστηριότητα του σε αντίθεση με αυτούς.



εικόνα 6: Ιστικός παράγοντας

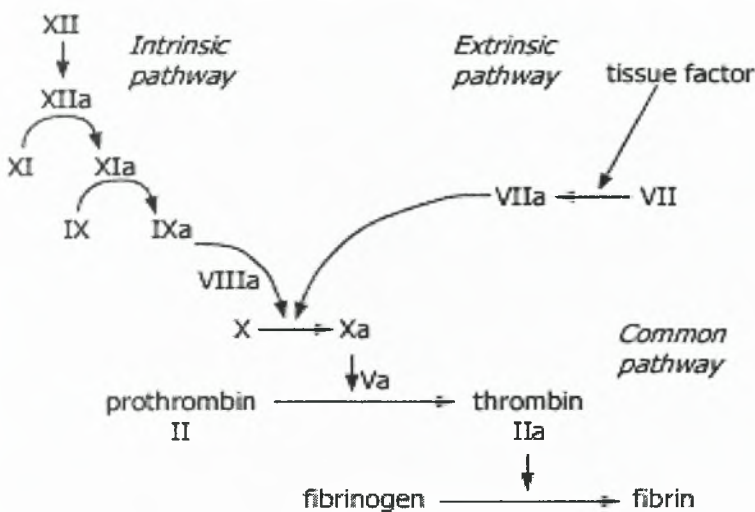
Η μοναδική ανάγκη για την πυροδότηση της πήξης από τον ΙΠ είναι η φυσική σύνδεσή του με τον παράγοντα VII ή με τον παράγοντα VIIa (Butenas S. et al, 2003).

A) 4. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ

Είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο που περιλαμβάνει μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων στις οποίες οι ανενεργοί παράγοντες (ζυμογόνα) μετατρέπονται σε ενεργοί (σερινικές πρωτεάσες) με τελικό στόχο την παραγωγή θρομβίνης και τη μετατροπή της μονομερούς ινικής σε ινική. Η πήξη του αίματος

πραγματοποιείται με δύο τρόπους, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7 (Monroe et al, 2002):

- Με τον ενδοαγγειακό μηχανισμό ή το καλούμενο ενδογενές σύστημα
- Με τον εξωαγγειακό μηχανισμό ή το καλούμενο εξωγενές σύστημα



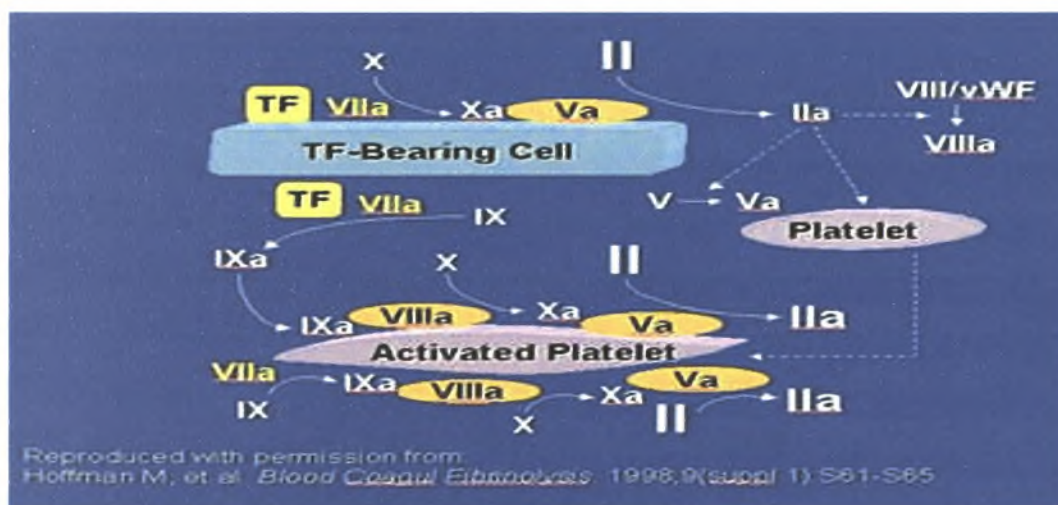
εικόνα 7: ενδογενής και εξωγενής δρόμος

Ουσιαστικά όμως πραγματοποιείται ταυτόχρονα και προς τις δύο κατευθύνσεις. Στο ενδογενές σύστημα, η πήξη του αίματος αρχίζει όταν οι ίνες κολλαγόνου που βρίσκονται κάτω από το επιθήλιο έρθουν σε επαφή με το πλάσμα. Αυτό γίνεται μετά από τραυματισμό ενός αγγείου, οπότε προκαλείται ενεργοποίηση των FXII και FXI, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του FIX σε FIXa. Ο τελευταίος σε συνδυασμό με τον FVIII και τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των συσσωρευμένων και των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, παρουσία ιόντων ασβεστίου, σχηματίζει το σύμπλοκο της ενδογενής δεκάσης που αποτελείται από τους ενεργοποιημένους παράγοντες VIIIa/IXa/ Ca^{++} /Φωσφολιποειδή. Το σύμπλοκο ενεργοποιεί τον FX σε FXa, οπότε ο τελευταίος σχηματίζει ένα νέο σύμπλοκο με τον FV, παρουσία ασβεστίου και φωσφολιπιδίων. Το νέο αυτό σύμπλοκο ονομάζεται σύμπλοκο προθρομβινάσης (ή θρομβοκινάσης ή θρομβοπλαστίνη) FXa/FVa/ Ca^{++} /φωσφολιποειδή συμβάλει στη μετατροπή του FII (προθρομβίνη) σε FIIa (θρομβίνη). Η σχηματιζόμενη θρομβίνη μετατρέπει το

ινωδογόνο σε διαλυτή ινική η οποία παρουσία ασβεστίου και του FXIIIa μετατρέπεται σε σταθερή ινική (Ansani N.T. et al, 2002).

Στο εξωγενές σύστημα η ενεργοποίηση ξεκινά με τη συμμετοχή του τραυματισμένου ιστού-ιστικός παράγοντας, των φωσφολιπιδίων από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και του FVII. Έτσι δημιουργείται το σύμπλοκο της εξωγενής δεκάσης ή του ιστικού παράγοντα (φωσφολιποειδή)/ FVIIa/FXa/Ca⁺⁺ που οδηγεί στη μετατροπή του FX σε FXa, οπότε ακολουθεί η ίδια αλληλουχία αντιδράσεων, όπως και στον ενδογενή δρόμο. Είναι φανερό η συσχέτιση των δύο φαινομενικά αποκομμένων μηχανισμών πήξεως. Έχει αποδειχθεί η διασταύρωση του ενδογενούς με τον εξωγενή δρόμο, αφού ο FIX μπορεί να ενεργοποιηθεί όχι μόνο από τον FXIa, αλλά και από το σύμπλοκο της εξωγενής δεκάσης (FVII/TF) μετά τη δημιουργία του FXa (Ruf W. et al, 2003). Επίσης ο FXI ενεργοποιείται και από την παραγόμενη θρομβίνη και ο FVII από τους FIX και FX, ενώ ο FXa ενεργοποιεί και μικρές ποσότητες των FVIII και FV (εικόνα 8).

Ο ενδογενής δρόμος διεξάγεται πιο γρήγορα από ότι ο εξωγενής δρόμος απουσία ιστικού παράγοντα. Παρουσία όμως ιστικού παράγοντα ο εξωγενής δρόμος είναι πολύ πιο γρήγορος. Το σύμπλοκο λοιπόν της ενδογενής δεκάσης FIXa/FVIIIa ενεργοποιεί τον παράγοντα X πενήντα φορές πιο αποτελεσματικά από το σύμπλοκο της εξωγενής δεκάσης FVIIa/TF.



εικόνα 8: μηχανισμός πήξης

Έτσι, ενώ με το δρόμο του ιστικού παράγοντα μπορούμε να ελέγξουμε την επάρκεια όλων των παραγόντων της πήξης (XII, XI, IX, X, V,II) τον

ενδογενή ελέγχουμε μόνο την έλλειψη του παράγοντα VII (Gerotziafas G.T., 1999).

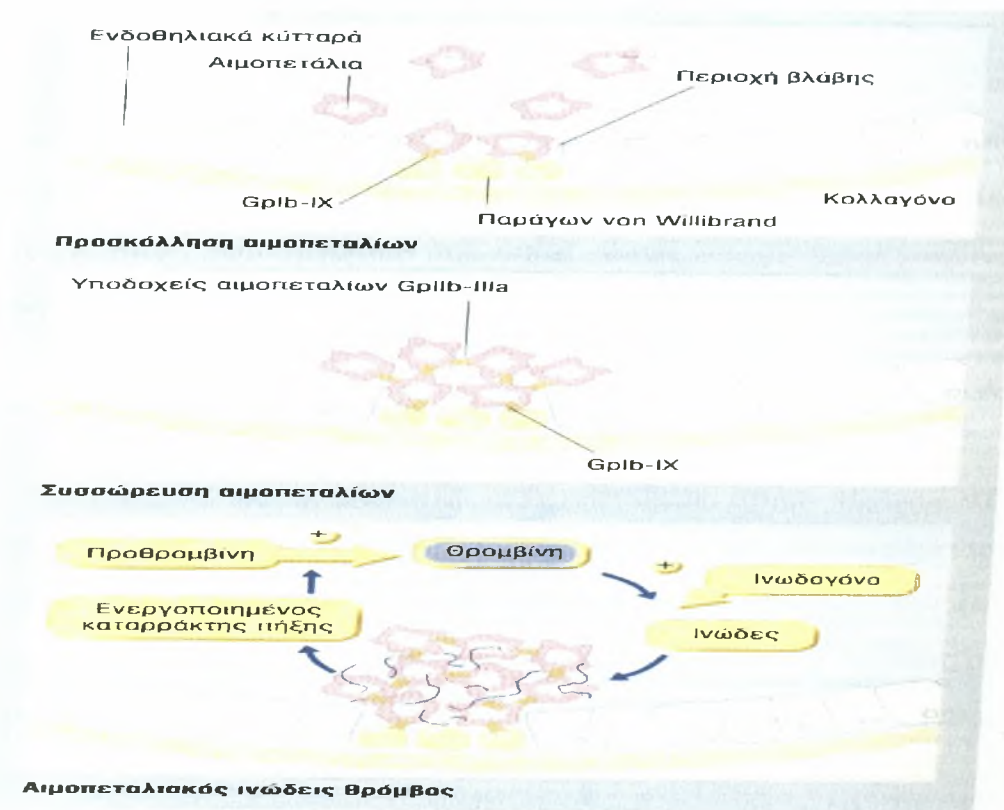
i) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΠΗΞΗ

Η ταχύτητα και η πρόοδος των αντιδράσεων της πήξης εξαρτώνται ουσιαστικά από τον καταλυτικό χαρακτήρα του σχηματισμού της θρομβίνης. Όλα τα στάδια που προηγούνται από τον σχηματισμό της δρουν συσσωρευτικά, σαν να επιφέρουν εκείνες τις ποσοτικές μεταβολές, ώστε να ανταποκριθούν στη δράση της θρομβίνης. Από τη στιγμή που θα παραχθούν τα πρώτα ίχνη της εκδηλώνεται η αντίδραση έκρηξη στην ταχύτητα και στην πρόοδο της πήξης. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη στην ικανότητα της θρομβίνης να δρα σε πολλά ταυτοχρόνως επίπεδα πολλαπλασιάζοντας έτσι το ρυθμό παραγωγής της (Μπέης Ις. et al, 2000). Η θρομβίνη ως κύριο ένζυμο όδευσης του μηχανισμού της πήξης, ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια, τον παράγοντα VIII και VIIIa που παίρνει μέρος με περισσότερα μόριά του στους σχηματισμούς της δεκάσης II και τον V σε Va που και αυτός με περισσότερα μόριά του συμμετέχει σε σχηματισμούς της προθρομβινάσης. Επίσης, υδρολύει το ινωδογόνο σε διαλυτά μονομερή ινικής και τον XIII σε XIIIa μονιμοποιώντας τα σχηματιζόμενα διαλυτά μονομερή της ινικής πολυμερίζοντάς τα.

ii) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΗΞΗ

Εκτός από το γεγονός ότι τα αιμοπετάλια (εικόνα 9) συσσωρεύονται και προσκολλώνται στο σημείο της βλάβης προκειμένου να σταματήσουν την αιμορραγία σκοπός τους είναι να λειτουργούν και ως πηγή φωσφολιπιδίων. Τα αιμοπετάλια μετά την ενεργοποίησή τους και την απελευθέρωση των ουσιών που περιέχουν, προσφέρουν στην τραυματική-θρομβογόνα επιφάνεια διάφορα φωσφολιποειδή (φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοσερίνη), στα οποία ενεργοποιείται το ενδογενές σύστημα, με αποτέλεσμα την παραγωγή θρομβίνης. Επιπλέον, ο ιστικός παράγοντας από την περιοχή της βλάβης ενεργοποιεί και τον εξωγενή δρόμο. Ο σχηματισμός της θρομβίνης, λοιπόν, σταθεροποιεί τον αιμοπεταλιακό θρόμβο δρώντας στην απελευθέρωση ενδοαιμοπεταλιακών ουσιών που συσσωρεύονται και ενεργοποιούν και νέα

και οδηγώντας στην τελική φάση της πήξης με τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινική. (Gerotziafas et al, 2004).



εικόνα 9: τρόπος δράσης αιμοπεταλίων στο μηχανισμό πήξη

iii) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΗΞΗ

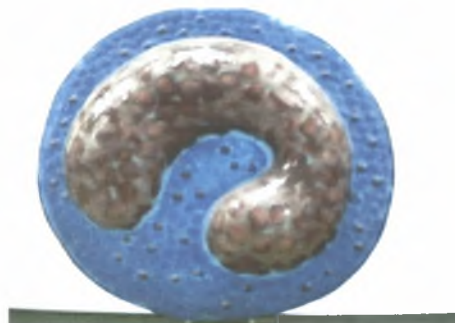
Το ασβέστιο έχει σπουδαίο ρόλο στην πήξη του αίματος, όπως φαίνεται μετά από προσθήκη σε σωληνάριο αντισηπτικού που δεσμεύει το ασβέστιο (όπως το κιτρικό νάτριο, το οξαλικό νάτριο ή το EDTA) αντίστοιχης ποσότητας αίματος, οπότε δεν παρατηρείται πήξη, ακόμη και μετά από εισαγωγή ιστικού εκχυλίσματος. Η παροχή ιόντων ασβεστίου στο σύστημα οδηγεί σε πήξη. Χάρη σε αυτή την αναστρέψιμη αντιπηκτική ιδιότητα των ουσιών που δεσμεύουν τα ιόντα ασβεστίου, γίνεται δυνατή η μελέτη του φαινομένου της πήξης μακριά από τον τόπο αιμοληψίας και σε δευτερότερο χρόνο (Laemmli, 1970).

Τα ιόντα ασβεστίου μετέχουν στην ενεργοποίηση της αρχικής αιμόστασης με τη σύνδεση του ινωδογόνου στους υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, με τη διαβίβαση του σήματος στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων με τη σύνδεσή του με τις α -πρωτεΐνες (ως κύριων μεσολαβητών-διαβιβαστών

του) και με την εκκίνηση της αντίδρασης απελευθέρωσης και την προσφορά όλων των αποθηκευμένων ουσιών στο περιβάλλον (λειτουργίες που αποδίδονται στην κινητοποίησή του από τις ενδοαιμοπεταλιακές του αποθήκες). Παράλληλα, μετέχουν στην ενεργοποίηση της πήξης συμβάλλοντας στην απελευθέρωση ουσιών που έχουν αντιπηκτικές ιδιότητες, παίρνουν μέρος στο σχηματισμό θρομβίνης και συμμετέχουν στη δημιουργία των ενζυμικών συμπλεγμάτων της πήξης, όπως της προθρομβινάσης, των δεκασών I και II.

iv) Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα μονοκύτταρα (εικόνα 10) διαθέτουν έναν απλό πυρήνα και ένα ελαφρώς κοκκώδες κυτταρόπλασμα. Παράγονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών και παρουσιάζουν φαγοκυτταρική ικανότητα. Έχουν καλά αναπτυγμένο σύστημα Golgi και πολλά λυσοσώματα που περιέχουν υπεροξειδάση και αρκετές όξινες υδρολάσες που χρησιμοποιούνται για τη διάλυση ιστικών υπολειμάτων μετά από χρόνιες φλεγμονές και για την ενδοκυτταρική καταστροφή μικροοργανισμών.



Εικόνα 10: μονοκύτταρο

Επίσης φέρουν υποδοχείς (MFR) που συνδέονται με τα σάκχαρα μαννόζη και φουκόζη στην επιφάνεια των μικροοργανισμών και με φθαρμένα σωματικά κύτταρα, όπως είναι τα γυρασμένα ερυθροκύτταρα και αντιγόνα της τάξης II του MHC που παίζουν ρόλο στην έκθεση των αντιγόνων στα T λεμφοκύτταρα. Εκτός από τα παραπάνω, τα μονοκύτταρα φέρουν υποδοχείς για κυτταροκίνες, όπως είναι οι IL-2 και IL-4 και η ιντερφερόνη γ. Παράγονται ακόμη συστατικά του συμπληρώματος, προσταγλανδίνες, ενεργά παράγωγα του οξυγόνου και νιτρικό οξύ (Page et al, 2000).

A) 5. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ

Οι αναστολείς δρουν σε διαφορετικά επίπεδα και με διαφορετική δυναμική. Στα πειράματα που ακολουθούν χρησιμοποιείται πειραματικά η αντιθρομβίνη III (AT-III). Είναι ο κυριότερος εκπρόσωπος των σερπινών και σε αυτό το ένζυμο στηρίζεται η δράση μιας μεγάλης κατηγορίας αντιπηκτικών, των ηπαρονοειδών. Είναι μία α-σφαιρίνη με 59 ή 65 kDa MB. Το μόριό της αποτελείται από μία απλή πολυπεπτιδική γλυκοπρωτεϊνική αλυσίδα, η οποία συγκροτείται από 425 υπόλοιπα αμινοξέων, τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς και τέσσερις αλυσίδες υδατανθράκων. Η δομή των περιοχών αρχίζει από το N-τελικό άκρο με την περιοχή σύνδεσης με την ηπαρίνη, ακολουθεί μια περιοχή πλούσια σε υδατάνθρακες και τελειώνει με την περιοχή σύνδεσής της με τις σερινικές πρωτεάσες (Vincenot A., 1997). Η ανθρώπινη AT-III παράγεται στο ήπαρ, βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και κυκλοφορεί στο πλάσμα με συγκέντρωση 0,2 mg/ml. Συγκεντρώσεις όπως αυτές επιτρέπουν την συνύπαρξή της με τη θρομβίνη, ενώ με την προσθήκη ηπαρίνης αυξάνεται 1000 φορές ο ρυθμός αδρανοποίησής της θρομβίνης (Gerotziafas G.T., 1998).

Σε σχέση με τους άλλους φυσιολογικούς αναστολείς η AT έχει τη μεγαλύτερη χημική συγγένεια με τη θρομβίνη και η εξέλιξη έχει τροποποιήσει το μόριο της με τέτοιο τρόπο, ώστε να αντιδρά με τη θρομβίνη. Ενώνονται στοιχειομετρικά 1:1 και εξουδετερώνεται η δομή της θρομβίνης με το σχηματισμό του σταθερού ισομοριακού, αλλά αδρανούς συμπλέγματος θρομβίνης-αντιθρομβίνης (T-AT). Αυτό πραγματοποιείται με την υδρόλυση του μορίου της θρομβίνης ή και άλλων ενζύμων των ειδικών δεσμών Arg-Ser (385-386 ή 393-394) στο C-τελικό μέρος του μορίου της AT-III. Μόλις το σύμπλεγμα σχηματίζεται, αποσύρεται από την κυκλοφορία σε λίγα λεπτά κυρίως με μηχανισμό κάθαρσης, που εντοπίζεται στα ηπατικά κύτταρα, ενώ μόνο ίχνη του μπορούν να ανιχνευτούν (Gerotziafas G.T. et al, 2003).

Κύριο γνώρισμα της δράσης της AT είναι η αργή ταχύτητα εξουδετέρωσης της θρομβίνης που γίνεται 50-1000 φορές μεγαλύτερη με την παρουσία ηπαρίνης. Ένα τμήμα της AT-III υπάρχει στο πλάσμα χωρίς ικανότητες αντιπηκτικές ή σύνδεσης με την ηπαρίνη. Η παρουσία της ηπαρίνης τροποποιώντας με τη σειρά της τη δομή της AT-III πιθανώς

αποκαλύπτει περισσότερες δραστικές περιοχές της. Η σύνδεση της ηπαρίνης με την AT-III είναι υπεύθυνη για την αντιπηκτική δράση της ηπαρίνης τόσο που, αν μια ηπαρίνη δε συνδέεται με την AT-III, δεν έχει αντιπηκτικές ιδιότητες. Τροποποίηση του μορίου της AT-III ή χρησιμοποίηση γενετικά διαταραγμένου μορίου, αναιρεί τις αντιπηκτικές ιδιότητες της ηπαρίνης. Το σύμπλεγμα AT-III- ηπαρίνης ασκεί τη δράση του σε όλα τα επίπεδα και τις φάσεις της πήξης (Ansani N.T., 2002). Αναστέλλει την ενεργοποίηση του συστήματος επαφής (τους παράγοντες XII, XI, ΠΚΚ, MMBK), τα ενζυμικά συμπλέγματα της πήξης, όπως η δεκάση II (VIIIa/IXa/PF3/Ca⁺⁺) και την προθρομβινάση (Xa/Va/PF3/ Ca⁺⁺), την ενεργοποίηση του παράγοντα XIII και των αιμοπεταλίων και την πλασμίνη. Δεν αναστέλλει τη δεκάση I (II/VIIa/ Ca⁺⁺), άποψη που όμως άρχισε να αμφισβητείται. Το 50% της αντιθρομβινικής δράσης του πλάσματος αντιστοιχεί στη δράση της AT-III (Weitz J.I., 2003).

B) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B) 1. Αντιδραστήρια-υλικά

Για τη μελέτη του συστήματος χρησιμοποιούνται:

Ρυθμιστικό διάλυμα ανασύστασης των παραγόντων:

Χρησιμοποιείται σαν φυσιολογικός ορός. Έχει το ίδιο pH και την ίδια ωσμωτική πίεση με αυτή των κυττάρων και χρησιμοποιείται για την ανασύσταση των λυοφυλιωμένων παραγόντων/ τροποποιητών της πήξης του αίματος και ως μέσο αραίωσης και διατήρησης των κυττάρων. Για 100 ml τέτοιου διαλύματος χρειάζονται:

0,2423 gr Tris-HCl

0,8766 gr NaCl

ρυθμίζεται το pH με HCl 7,4.

Είναι οι τελικές συγκεντρώσεις:

20 mM Tris-HCl

0,15 M NaCl

pH 7,4

Βιολογικά υλικά:

Χρησιμοποιείται αίμα και πλάσμα φυσιολογικών ανθρώπων, απομονωμένα αιμοπετάλια (platelets) και μονοκύτταρα U937 (5000/ml).

Βιοχημικά υλικά:

Χρησιμοποιείται ανασυσταμένος παράγοντας VIIa Novoseven, από τη Novo Nordisk, θρομβοπλασίνη (TP, kit Thrombomat R1, Biomerieux Sa), purified AT III (αντιθρομβίνη III, Diagnostica Stago), rabbit anti-human factor II Serum (προθρομβίνη, Assera II, Diagnostica Stago), anti-rabbit alkaline phosphatase από Gibco BRL, BCIP (bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) και NBT (Nitro blue tetrazolium liquid) από τη Sigma, το γάλα είναι nonfat dry milk Carnation από την Nestle, France.

Όργανα :

Φυγόκεντρος τύπου: Sigma-201 M, συσκευή ηλεκτροφόρησης διαστάσεων 10x10 cm, συσκευή για το Blot: semi dry-blot apparatus, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, αναδευτήρας τύπου : Edmund Buhler Swip KL-2 και vortex.

B) 2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια (DNA, RNA) διαχωρίζονται καθώς κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μέσα από τους πόρους ενός πηκτώματος. Η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών (U) ή οποιουδήποτε άλλου καθαρού φορτίου εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο του μορίου (Z) και από τον συντελεστή τριβής (f) σύμφωνα με τον τύπο $U = E \cdot Z / f$. Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής f_v που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται καθώς επίσης και από την πυκνότητα και το ιξώδες του μέσου (πήκτωμα) (Gerotziafas G.T., 1999).

Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή παρά σε υγρό, διότι η πηκτή καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας (απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό) και λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι

ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Το πηκτωμα μπορεί να είναι από άμυλο ή αγαρόζη κυρίως όμως χρησιμοποιείται το πολυακρυλαμίδιο, γιατί παρέχει μεγάλη επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων, είναι χημικά αδρανές, διαφανές, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος και επιπλέον το μέγεθος των πόρων του μπορεί να ποικίλει σημαντικά.

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται από το συμπολυμερισμό ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{CN}_2$) και N,N μεθυλενοδιακρυλαμιδίου ή bis ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{C}_n\text{H}_2-\text{CH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) σε αναλογία 30/1 w/w αντίστοιχα. Το bis ακρυλαμίδιο συνδέει τις μακριές αλυσίδες του πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου, σχηματίζοντας έτσι ένα τρισδιάστατο πλέγμα, το μέγεθος των πόρων του οποίου εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών που παράγονται από το σύστημα υπερθειικού αμμωνίου (APS) και N,N,N,N τετραμέθυλοαιθυλοδιαμίνης (TEMED). Το TEMED προκαλεί την δημιουργία ελευθέρων ριζών από το APS οι οποίες καταλύουν τον πολυμερισμό.

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου μπορεί να είναι κυλινδρικές ή επίπεδες, οπότε ο πολυμερισμός γίνεται είτε μέσα σε γυάλινα κυλινδρικά σωληνάκια είτε ανάμεσα σε δύο γυάλινες πλάκες. Το σύστημα ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι συνεχές ή ασυνεχές. Στο συνεχές σύστημα χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα στην πηκτή και στα δοχεία ηλεκτροδίων. Στο ασυνεχές σύστημα διακρίνονται δύο πηκτές, η πηκτή επιστοίβαξης και η πηκτή διαχωρισμού. Υπάρχουν και τρία διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα ηλεκτροδίων, το διάλυμα ηλεκτροδίων, το διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης και το διάλυμα πηκτής διαχωρισμού. Η σύσταση, το pH και το μέγεθος των πόρων των δύο πηκτών είναι τέτοια, ώστε στην πηκτή επιστοίβαξης τα δείγματα να συμπυκνώνονται και στο τέλος οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης. Στην πηκτή διαχωρισμού επιτελείται ο διαχωρισμός τους, λόγω διαφορετικής κινητικότητας κάθε πρωτεΐνης. Έτσι επιτυγχάνεται πολύ καλύτερος διαχωρισμός από ότι στο συνεχές σύστημα.

Τέλος, η ηλεκτροφόρηση δύναται να γίνει παρουσία ή απουσία αποδιατακτικών μέσων, όπως του απορρυπαντικού SDS (θειικό δωδεκανικό νάτριο) ή της ουρίας. Στην πρώτη περίπτωση (ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες), τα πρωτεϊνικά μόρια διατηρούν άθικτες τις ανώτερες διαμορφώσεις τους και παραμένουν κατά κανόνα δραστικά. Στη δεύτερη περίπτωση (ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες) αποδιατάσσονται οι τυχόν υπομονάδες των πρωτεϊνών λαμβάνοντας τυχαίες διαμορφώσεις και διαχωρίζονται (Gerotziagas G.T., 1999).

B) 2.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΜΕΤΟΥΣΙΩΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ SDS (SDS-PAGE)

Με τη μέθοδο αυτή (εικόνα 11) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση αποκλειστικά το μοριακό τους βάρος. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται πάνω στη ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με υδρόφοβους δεσμούς. Η δέσμευση γίνεται με σταθερό ποσό SDS ανά μονάδα βάρους πρωτεΐνης (περίπου 1,4 g SDSg πρωτεΐνης) και έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, την αποδιάταξή της και τη δημιουργία ενός επιμήκους συμπλόκου SDS πολυπεπτιδικής αλυσίδας με καθαρό αρνητικό φορτίο και περίπου σταθερό λόγο φορτίου ανά μονάδα μάζας πολυπεπτιδίου.



εικόνα 11: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Συνεπώς το ολικό φορτίο του συμπλόκου εξαρτάται μόνο από το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και η ηλεκτροφορητική κινητικότητά του στην πηκτή αποκλειστικά από το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου (Laemmli, 1970).

Έτσι, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης ή των υπομονάδων αυτής, έπειτα από τη σύγκριση της κινητικότητας με τις κινητικότητες πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (μαρτύρων, εικόνα 12) στις ίδιες συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα η κινητικότητα ενός πολυπεπτιδίου στην SDS-PAGE είναι γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου του μοριακού του βάρους. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταυτοποίηση, διαχωρισμό και χαρακτηρισμό πρωτεϊνών ή των υπομονάδων τους, καθώς επίσης για τον έλεγχο ομοιογένειας ενός πρωτεϊνικού κλάσματος. Παρουσιάζει όμως ορισμένους περιορισμούς. Έτσι, πολύ βασικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες με μεγάλο βαθμό γλυκοσυλίωσης (επειδή δεσμεύουν απορρυπαντικό μόνο στο πρωτεϊνικό τμήμα τους) κινούνται πιο αργά στην πηκτή με αποτέλεσμα να τις ταυτοποιούμε λανθασμένα. Επίσης, λανθασμένο μοριακό βάρος μπορεί να προκύψει και για ορισμένες περιπτώσεις πρωτεϊνών που δεν αποδιατάσσονται πλήρως με το SDS (Gerotziakas G.T. , 1999).

Η κατακόρυφη συσκευή χρησιμοποιείται κυρίως για ηλεκτροφορήσεις σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου, ενώ η οριζόντια για πηκτές αγαρόζης. Και στις δύο περιπτώσεις το δείγμα τοποθετείται με τη μορφή ζώνης οπότε τα μακρομόρια (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) κατά την κίνησή τους, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου για ορισμένο χρονικό διάστημα καταλαμβάνουν ορισμένες θέσεις στην πηκτή.



εικόνα 12: μάρτυρες

Λαμβάνεται τελικά ένα σύνολο ζωνών που αντιστοιχούν στα διάφορα μακρομόρια. Συνήθως οι ζώνες γίνονται εμφανείς με την προσθήκη κατάλληλης βαφής ή με κάποια άλλη μέθοδο που μπορεί να στηρίζεται στο φαινόμενο φθορισμού ή στην εκπομπή ακτινοβολίας ισοτόπων κ ά .

B) 2.2 Διαλύματα για SDS ηλεκτροφόρηση και δημιουργία πηκτής

Για την δημιουργία της πηκτής ηλεκτροφόρησης απαιτούνται δύο διαλύματα, το ένα για την πηκτική διαχωρισμού (seperating gel) και το άλλο για την πηκτική επιστοίβαξης (stacking gel) που εισάγεται στο επάνω μέρος της συσκευής και προκαλεί την επιστοίβαξη του δείγματος για να εισέλθει στη συνέχεια η άλλη πηκτική και να γίνει ο διαχωρισμός. Τα διαλύματα προετοιμάζονται ως εξής (Laemmli, 1970):

Πηκτική διαχωρισμού (20 ml):

10 ml για το bottom και 10 ml ως seperating πάνω από το bottom:

acrylamide / bis acrylamide 30% / 1%

tris-HCl pH 8,9 1,875 M

SDS 10%

APS 10%

TEMED

H₂O δις-απιονισμένο.

Για τις τελικές συγκεντρώσεις από τα stock διαλύματα απαιτούνται:

6,66 ml ακρυλαμίδιο

4 ml Tris-HCl pH 8,9

1 ml SDS

60 μl Temed

80 μl APS

Συμπληρώνεται μέχρι 20 ml με δις-απιονισμένο νερό και χωρίζονται σε δύο μέρη των 10 ml.

Τελικά προκύπτει ένα διάλυμα 10 ml seperating και ένα ίδιο διάλυμα bottom 10 ml με τελικές συγκεντρώσεις:

10% w/v ακρυλαμίδιο,

Tris-HCl pH 8,9 0,375 M

SDS 0,5%

πηκτική επιστοίβαξης (10 ml):

Χρησιμοποιούνται τα ίδια stock διαλύματα, εκτός από το Tris-HCl που χρειάζεται το διάλυμα 0,625 M, pH 6,8. Απαιτείται διάλυμα:

1,66 ml ακρυλαμίδιο

2 ml Tris-HCl pH 6,8

0,5 ml SDS

30 μl TEMED

80 μl APS

Γίνεται προσθήκη δις-απιονισμένου νερού και τα 10 ml προστίθενται πάνω από την πηκτή διαχωρισμού. Σε περίπτωση που υπάρχουν φυσαλίδες μπορεί να ανασταλεί η αγωγή του ηλεκτρικού ρεύματος, οπότε για την αποφυγή τους, εισάγεται μια μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης πάνω από κάθε στιβάδα.

Πάνω από την πηκτή επιστοίβαξης τοποθετείται το χτενάκι, ώστε να δημιουργηθούν οι διαχωριστικές γραμμές και σχηματίζονται τα κενά όπου εισάγονται τα δείγματα με σκοπό να μην αναμειχθούν μεταξύ τους.

Ρόλος των συστατικών:

SDS: αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες ώστε να προκύψουν πολύ-ανιολικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων που διαχωρίζονται στη συνέχεια ηλεκτροφορητικά.

acrylamide/bis acrylamide: πολυμερίζονται εύκολα με την προσθήκη ενός συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες

APS (υπερθειικό αμμώνιο): προκαλεί τη δημιουργία ελεύθερων ριζών. Ως εκκινητής του πολυμερισμού προστίθενται πάντα τελευταίο.

TEMED: καταλύει την διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού και προστίθεται ακριβώς πριν από το APS.

Προετοιμασία πριν την εισαγωγή δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης

Πριν την εισαγωγή των δειγμάτων προστίθεται σε αυτά loading buffer (L.B.) ως χρωστική, ώστε να διαφαίνεται η πορεία τους και η τελικές τους θέσεις. Για την παρασκευή 10 ml L.B. ως stock απαιτούνται:

0,3125 M Tris-HCl pH 6,8

10% w/v SDS

50% v/v glycerol

0,1% w/v bromophenol blue

Για να χρησιμοποιηθεί αραιώνεται 5 φορές και προκύπτουν οι τελικές συγκεντρώσεις:

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

2% w/v SDS

10% v/v glycerol

0,02% w/v bromophenol blue

2% μερκαπτοαιθανόλη

Η μερκαπτοαιθανόλη χρησιμοποιείται για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις επιμέρους αλυσίδες τους.

Στο επάνω και κάτω μέρος της συσκευής ηλεκτροφόρησης εισάγεται το running buffer, ώστε να αρχίσει να άγεται το ρεύμα και να μεταφέρει τις αρνητικά πια φορτισμένες πρωτεΐνες στο κάτω μέρος της συσκευής, δηλαδή στην άνοδο. Για την παρασκευή πρότυπου διαλύματος 500 ml χρησιμοποιούνται:

72 gr γλυκερίνης

15 gr Tris-HCl και

5 gr SDS

Το SDS προστίθεται τελευταίο, αφού πρώτα ρυθμιστεί το pH στο 8,8. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει ένα πυκνό διάλυμα το οποίο για να χρησιμοποιηθεί πρέπει να αραιωθεί 10 φορές.

Αφού ετοιμαστεί η συσκευή και εισαχθούν τα δείγματα προσεκτικά, το σύστημα τροφοδοτείται με $I=25$ mA. Όταν τα δείγματα φτάσουν στην πηκτή διαχωρισμού, ρυθμίζεται το σύστημα σε $I=35$ mA. Μόλις τα δείγματα φτάσουν στο bottom σταματά η τροφοδότηση και ακολουθείται η τεχνική του Western Blotting για να ηλεκτρομεταφερθούν οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη και να γίνουν οι παρατηρήσεις.

B) 2. 3. ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ SDS ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Η διαδικασία ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών από SDS σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF (immobilon) είναι γνωστή ως Western blotting (εικόνα 13). Βασίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS που είναι αρνητικά φορτισμένα μετακινούνται κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού

πεδίου προς την άνοδο, εξέρχονται από την πηκτή και καθηλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Πρωτεΐνες οι οποίες έχουν καθηλωθεί σε μεμβράνη μπορούν να ανιχνευτούν με χρήση αντισωμάτων ή να γίνει προσδιορισμός της αμινοτελικής αμινοξικής αλληλουχίας τους σε αυτόματο αναλυτή (στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται αποκλειστικά η μεμβράνη PVDF).



εικόνα 13: Προετοιμασία για την τεχνική Western Blotting

B) 2. 4. Τεχνική Western blotting και διαλύματα απαραίτητα για αυτήν

Η τεχνική του Western blot χρησιμοποιείται, επειδή υπάρχουν τα κατάλληλα αντισώματα στα οποία μπορούν να δεσμεύονται οι πρωτεΐνες. Έτσι, μπορούν να μεταφέρονται οι πρωτεΐνες σε μία μεμβράνη για να δεσμευτούν από το αντίσωμα. Το αντίσωμα λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους του δεν μπορεί να διαπεράσει την πηκτή. Παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται τα παρακάτω διαλύματα (Gerotziafas G.T., 1999):

Transfer buffer: για την παρασκευή 300 ml απαιτούνται:

4,5 gr Tris-HCl

2,3 gr Borate

6 ml 10% SDS

Το pH δεν χρειάζεται να ρυθμιστεί και μετά την αραιώση του διαλύματος στον τελικό όγκο είναι 8,58. Το διάλυμα χρησιμοποιείται ως stock και για τη συμμετοχή του στις αντιδράσεις αραιώνεται 10 φορές.

Τελικές συγκεντρώσεις:

125 m M Tris-HCl

125 mM Borate (Boric acid)

0,2 % SDS

pH 8,58

PBS: για την παρασκευή 300 ml χρειάζονται:

24 gr NaCl

0,6 gr KCl

4,32 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,6 gr KH_2PO_4

Γίνεται αποστείρωση σε χύτρα και ρυθμίζεται το pH 7,4 και το διάλυμα χρησιμοποιείται αραιωμένο επί 10. Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι:

137 mM NaCl

2,68 mM KCl

8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

147 mM KH_2PO_4

pH 7,4

Alkaline phosphate buffer: για την παρασκευή 100 ml απαιτούνται 5,84 gr

NaCl 1 M

2 ml MgCl_2 8,5 M

12,114 gr Tris-HCl 1 M

Το pH ρυθμίζεται στο 9,5 με το Tris και ύστερα γίνεται προσθήκη NaCl και MgCl_2 . Πραγματοποιείται αραιώση 10 φορές και οι τελικές συγκεντρώσεις είναι:

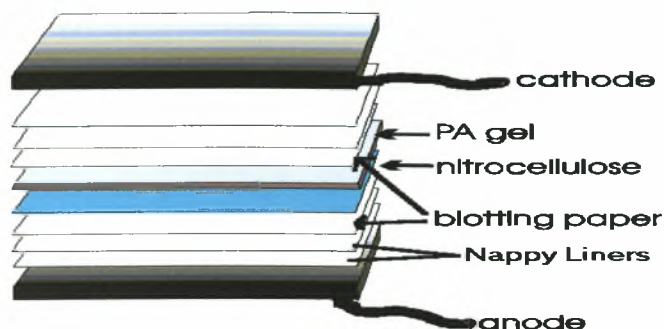
5,84 gr NaCl

2 ml MgCl_2 2,5 M

12,114 gr Tris-HCl

pH 9,5

Αφού φτάσουν οι πρωτεΐνες στο bottom της συσκευής, κόβεται το gel που περιέχει τις διαδρομές των πρωτεϊνών. Τοποθετείται ως κάτω στρώση στη συσκευή το χαρτί Whatman, αφού πρώτα εμποτιστεί στο transfer buffer. Ύστερα τοποθετείται το ειδικό πλαστικό της συσκευής και μετά η ειδική μεμβράνη νιτροκυταρίνης (εμποτισμένη με transfer buffer) όπου μεταφέρονται οι πρωτεΐνες από το gel. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετείται το gel και τέλος ένα ακόμη χαρτί Whatman σε μεγάλο μέγεθος, αφού έχει εμποτιστεί και αυτό σε transfer buffer (εικόνα 14).



εικόνα 14: προετοιμασία για την τεχνική Western Blotting

Έχει μεγάλη σημασία να μην υπάρχουν φυσαλίδες, διότι δεν επιτρέπουν τη διέλευση του ρεύματος. Διαβιβάζεται ηλεκτρικό ρεύμα στα 72 mA και χρονομετρείται 1,5 ώρα στη συσκευή (Gerotziafas G.T., 1999).

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το gel στη μεμβράνη βασίζεται στην κίνηση των πρωτεϊνών που είναι συμπλεγμένες με SDS (αρνητικό φορτίο) από την πηκτή προς την μεμβράνη. Όταν, λοιπόν, εφαρμοστεί ηλεκτρικό δυναμικό μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης, εγκλωβίζονται οι πρωτεΐνες στο πλέγμα της πολύ ευαίσθητης μεμβράνης.

Αφού μεταφερθούν οι πρωτεΐνες στη μεμβράνη, ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

a) Τοποθετείται η μεμβράνη σε διάλυμα γάλακτος 5 % w/v σε PBS (προσθέτονται 2,5 gr γάλα σε σκόνη σε 50 ml PBS) για 45 λεπτά για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η παραπάνω διαδικασία συμβαίνει για να κορεστεί η μεμβράνη με τις πρωτεΐνες του γάλακτος, ώστε να μην υπάρχουν κενά και το αντίσωμα που εισέρχεται μετά να δεσμεύεται μόνο στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη για την οποία προστίθεται.

b) Αμέσως μετά χύνεται το γάλα και προσθέτονται 2,5 ml αντίσωμα assera II σε 10 ml γάλα 5% w/v σε PBS (αραίωση 1/4000). Γίνεται ανάδευση του διαλύματος με την μεμβράνη για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια αφήνονται όλη τη νύχτα στο ψυγείο, ώστε να πραγματοποιηθεί δέσμευση στην αντίστοιχη πρωτεΐνη. Εναλλακτικά αναδεύεται η μεμβράνη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα δεσμεύει μόνο τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη για την οποία προστέθηκε.

c) Ακολουθούν δύο πεντάλεπτα ξεπλύματα με διάλυμα PBS με tween (0,5 ml tween σε 100 ml διαλύματος PBS).

d) Σειρά έχει η επώαση με antirabbit (δευτερεύον αντίσωμα), που δεσμεύει το αντίσωμα και βοηθάει στη χρώση. Προσθέτονται 5 µl antirabbit σε 10 ml του προηγούμενου διαλύματος PBS με γάλα (αραίωση 1/2000) στη μεμβράνη και πραγματοποιείται επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή όλη τη νύχτα κάτω από ψύξη. Το antirabbit θα μπορούσαμε να χαρακτηριστεί ως το αντί-αντίσωμα.

e) Ξεπλένεται 2 φορές η μεμβράνη για 5 λεπτά την κάθε φορά με PBS και tween και άλλες δύο φορές για πέντε λεπτά την κάθε μία μόνο με PBS.

f) Στο σημείο που δεσμεύεται το antirabbit παρατηρείται χρώση, επομένως και στο αντίσωμα και στην πρωτεΐνη. Προσθέτονται 40 µl NBT και 20 µl BCIP σε 10 ml alkaline phosphatase buffer.

g) Ακολουθεί ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες, ξεπλένεται η μεμβράνη με λίγο νερό και τοποθετείται απαλά στο χαρτί Whatman για παρατήρηση και εξαγωγή συμπερασμάτων.

B) 3. Προετοιμασία των βιολογικών υλικών

Σ' αυτή τη διπλωματική εργασία γίνεται μελέτη *in vitro* της μετατροπής της προθρομβίνης (FII) σε θρομβίνη (FIIa) κατά τον εξωγενή δρόμο, όταν επιδρούν σε αυτόν διάφοροι τροποποιητές της πήξης. Η μελέτη πραγματοποιείται με εξειδικευμένες τεχνικές προσδιορισμού των δύο αυτών παραγόντων της πήξης που βασίζονται στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου και στην τεχνική της ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών από SDS σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης που είναι γνωστή ως Western blotting.

Επίσης γίνεται προετοιμασία και επεξεργασία των δειγμάτων αίματος τα οποία προήλθαν από υγιείς ανθρώπους και αποτελούν αντιπροσωπευτικό δείγμα. Για τα πειράματα χρησιμοποιείται ολικό αίμα, αίμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (platelet rich plasma, PRP), αίμα φτωχό σε αιμοπετάλια (platelet poor plasma, PPP) και απομονωμένα μονοκύτταρα (Gerotziafas G.T., 1999).

i) Για την παρασκευή πλάσματος φτωχού σε αιμοπετάλια απαιτείται συγκεκριμένη διαδικασία. Από αιματολογικό εργαστήριο παραλαμβάνεται

ολικό αίμα με αντιπηκτικά άλατα του κιτρικού οξέος που προέχεται από όσο το δυνατό περισσότερους δότες, ώστε να μπορεί να χαρακτηριστεί ως αντιπροσωπευτικό δείγμα, δηλαδή φυσιολογικό. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται τα δείγματα για 12 λεπτά στις 6000 rpm και κρατείται το υπερκείμενο. Για την παρασκευή πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια αρκεί η ανάδευση των δειγμάτων ελαφρώς με το χέρι. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα δείγματα χρησιμοποιούνται αυθημερόν.

ii) Και για την προετοιμασία των αιμοπεταλίων απαιτείται συγκεκριμένη διαδικασία. Πετυχαίνεται απομόνωση αιμοπεταλίων από το ολικό αίμα με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Χρησιμοποιείται στήλη που περιέχει υλικό πλήρωσης sephadex G-50 (όγκος στήλης 40 ml). Αφού παραλαμβάνεται το ολικό αίμα 25 ml φυγοκεντρείται στις 1000 rpm για 5 λεπτά, ώστε να απομακρύνονται τα υπόλοιπα κύτταρα των αιμοπεταλίων από το υπερκείμενο και να παραλαμβάνεται φυσιολογικό PRP. Ακολουθεί πάλι φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 20 λεπτά και δημιουργείται ίζημα. Εδώ εμπεριέχονται αιμοπετάλια που διαλυτοποιούνται σε 1,5 ml buffer στήλης (0,3 Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,4). Στη συνέχεια περνούν από τη στήλη, τροφοδοτείται η στήλη με buffer και συλλέγονται τα κλάσματα ανά 1 ml. Φωτομετρείται το κάθε κλάσμα σε μήκος κύματος 280 nm, όπου απορροφούν τα αιμοπετάλια και παίρνονται τα παρακάτω κλάσματα με τις αντίστοιχες απορροφήσεις.

Κλάσμα	A ²⁸⁰	Κλάσμα	A ²⁸⁰
1	0,009	7	3,000
3	0,007	9	3,000
4	0,007	10	0,983
5	0,007	11	0,355
6	0,007	12	0,193

Συλλέγονται τα κλάσματα με την μεγαλύτερη απορρόφηση, δηλαδή τα 8, 9 και 10 και αποσπούνται τα αιμοπετάλια μετά από φυγοκέντρωση σε 6000 rpm για 5 λεπτά. Από τα 25 ml του αρχικού ολικού αίματος απομονώνονται 5 10⁹

αιμοπετάλια σε 1 ml buffer A, δηλαδή 5000000/μl. Με αρραίωση αυτού του stock διαλύματος αιμοπεταλίων 20 φορές, προκύπτει η φυσιολογική συγκέντρωση 250000 αιμοπετάλια/ μl.

- Τα μονοκύτταρα (U937) που χρησιμοποιούνται χορηγήθηκαν από εργαστήριο στην Αθήνα έτοιμα για τη συμμετοχή τους στο πειραματικό μέρος και δεν υπάρχει κάποια περαιτέρω επεξεργασία τους.

iii) Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία για την προετοιμασία του κάθε δείγματος. Κάθε φορά αποσπώνται 10 μl από το κάθε δείγμα και προστίθενται σε κάθε erpendorf ξεχωριστά 5 μl loading buffer, 5 μl δις-απεσταγμένο νερό και από 2 μl μερκαπτοαιθανόλη. Αφήνονται τα δείγματα για 4 λεπτά σε κατσαρόλα με ζεστό νερό, για να γίνει πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών και φυγοκεντρούνται σε χαμηλές στροφές για την εύκολη παραλαβή των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση.

Σε κάθε πείραμα που γίνεται τα δείγματα διαφέρουν σε ένα παράγοντα κάθε φορά. Έτσι, άλλες φορές διαφέρει η συγκέντρωση και άλλες φορές ο χρόνος επώασης. Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιείται το Buffer A. Επίσης ο τελικός όγκος σε όλα τα δείγματα που προετοιμάζονται είναι 100 μl και συμπληρώνεται το καθένα με νερό δις απιονισμένο μέχρι 400 μl (Gerotziakas G.T. , 1999).

Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου, γιατί απαιτούνται τα ιόντα Ca, τα οποία όμως είναι δεσμευμένα και πρέπει να αποδεσμευτούν. Η βέλτιστη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου είναι τα 8 μl. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη EDTA που δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου. Η συγκέντρωση EDTA που συνήθως χρησιμοποιείται είναι τα 40 μl, καθώς από πρέπει να είναι η πενταπλάσια συγκέντρωση από αυτή των ιόντων ασβεστίου.

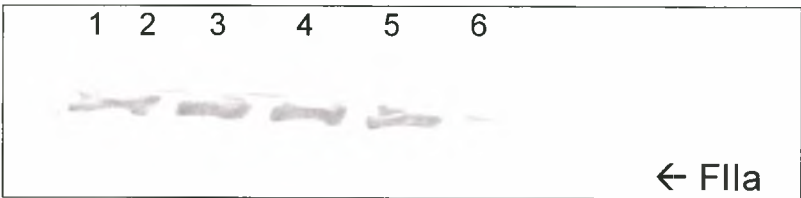
Η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης είναι οι 37 βαθμοί Κελσίου στο υδατόλουτρο για τον κάθε σωλήνα που περιέχει δείγμα και αυτές ακριβώς οι συνθήκες ακολουθούνται στην κάθε πειραματική διαδικασία που ακολουθεί.

B) 4. Βελτιστοποίηση της μεθόδου in vitro

i) Κινητική της ενεργοποίησης του δρόμου του ιστικού παράγοντα (TF) από PPP σε διαφορετικούς χρόνους

Σε 6 erpendorf εισάγονται από 40 μl φυσιολογικού πλάσματος PPP και από 52 μl buffer A. Ο χρόνος επώασης ποικίλει. Αφού συμπληρωθούν τα δείγματα με 92 ml, η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm, οπότε ο τελικός όγκος γίνεται 100 μl) και σταματά με την προσθήκη 30 μl EDTA.

α/α	1	2	3	4	5	6
Χρόνος(min)	0	2	4	10	30	60



Οι ζωνώσεις στο επάνω μέρος αντιπροσωπεύουν την προθρομβίνη και η κάτω ζώνη την θρομβίνη

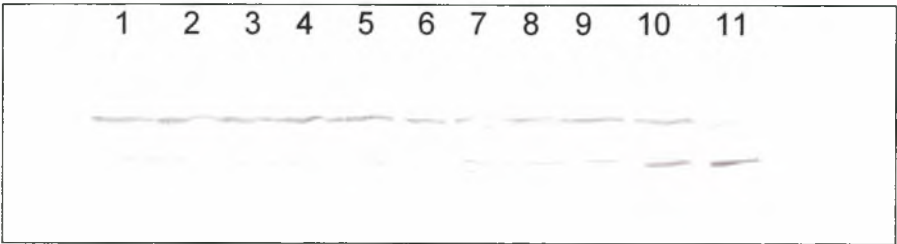
ii) Επίδραση θρόμβου στην ενεργοποίηση του δρόμου του ιστικού παράγοντα (TF) απουσία του FIX (DIX)

α) Παρουσία και απουσία του FVIIa σε διαφορετικούς χρόνους

Χρησιμοποιείται deficient IX (DIX) που είναι τεχνητό πλάσμα χωρίς τον παράγοντα πήξης IX, δηλαδή όπως ακριβώς συμβαίνει στην περίπτωση ασθενών με αιμορροφιλία τύπου B. Σε έντεκα erpendorf ξεχωριστά εισάγονται 40 μl πλάσματος και 40 μl TP (αραιωμένη 1/400). Στα πρώτα 6 δείγματα εισάγονται από 12 μl buffer A και στα υπόλοιπα 5 δείγματα από 12 μl VIIa (200 μg/ml). (Για τον παράγοντα VIIa 600 μg/ml ή 12000 nm/lt. Ακολουθεί αραιώση σε Buffer A. Έτσι υπάρχουν 50 μl παράγοντα VIIa στα οποία

προσθέτονται 250 µl Buffer A και πετυχαίνεται αραιώση 1:6). Οι χρόνοι είναι διαφορετικοί. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 µl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 50 µl EDTA.

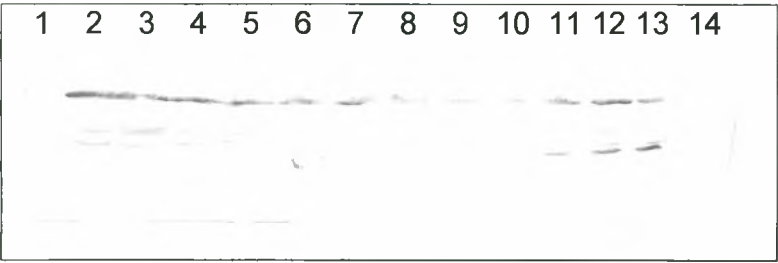
α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Χρόνος(min)	0	1	2	5	10	20	1	2	5	10	20
Buffer A (µl)	12	12	12	12	12	12	-	-	-	-	-
Vlla (nm)	-	-	-	-	-	-	240	240	240	240	240



β) Παρουσία και απουσία θρομβοπλαστίνης (TP) και παρουσία ή απουσία του FVlla σε διαφορετικούς χρόνους

Ετοιμάζονται 14 erpendorf. Το δεύτερο δείγμα περιέχει τους μάρτυρες. Σε όλα τα υπόλοιπα προσθέτονται από 40 µl πλάσματος DIX. Στα δείγματα 6,7 προσθέτονται 240 nm Vlla, στα 8,9,10,11,12 εισάγονται 40 µl TP και στα 13,14,1 εισάγονται 40 µl TP και 12 µl Vlla και τέλος συμπληρώνονται με buffer A στον τελικό όγκο. Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη 8 µl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με εισαγωγή 50 µl EDTA.

α/α	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Min	30	0	20	30	20	30	10	20	20	30	30	10	20
TP (µl)	40	-	-	-	-	-	40	40	40	40	40	40	40
Buffer A (µl)	-	52	52	52	40	40	12	12	12	12	12	-	-
Vlla (nm)	240	-	-	-	240	240	-	-	-	-	-	240	240

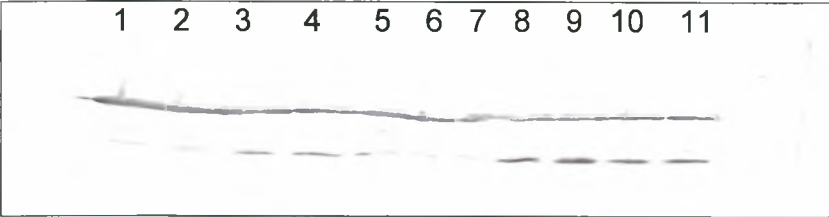


Τα δείγματα 9 και 10 είναι τα ίδια, όπως τα ίδια είναι και τα δείγματα 11 και 12, καθώς έγινε μεταφορά από το ένα δείγμα στο άλλο κατά τη μεταφορά τους στη συσκευή για ηλεκτροφόρηση. Δεν αποτυπώνονται καλά στην συγκεκριμένη περίπτωση τα δείγματα στις διαδρομές 1 και 14 κατά την τεχνική του Western blotting.

γ) Παρουσία FVIIa και παρουσία ή απουσία θρομβοπλαστίνης (TP) σε διαφορετικούς χρόνους

Εισάγονται πάλι 40 μl πλάσματος DIX και 240 nm VIIa σε 11 erpendorf. Στα 6 τελευταία δείγματα μόνο εισάγονται επίσης και 40 μl TP και όλα τα δείγματα συμπληρώνονται με buffer A στον τελικό όγκο. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 50 μl EDTA.

α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Min	10	20	30	40	50	10	10	20	30	40	50
TP(μl)	-	-	-	-	-	40	40	40	40	40	40
Buffer A (μl)	40	40	40	40	40	-	-	-	-	-	-
VIIa(nm)	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240

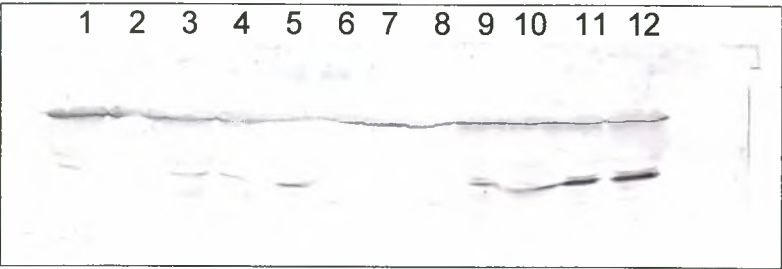


Τα δείγματα 7 και 8 είναι τα ίδια, διότι πραγματοποιήθηκε μεταφορά από το ένα δείγμα στο άλλο κατά την εισαγωγή τους στη συσκευή για ηλεκτροφόρηση.

δ) Παρουσία FVIIa και αιμοπεταλίων, παρουσία μόνο FVIIa και παρουσία μόνο αιμοπεταλίων σε διαφορετικούς χρόνους

Σε 12 erpendorf εισάγονται 40 μl πλάσματος DIX. Στα πρώτα 8 δείγματα προσθέτονται και 20 μl αιμοπετάλια . Στα δείγματα 5-8 εισάγονται από 240 nm VIIa. Δημιουργείται ένα stock διάλυμα με 360 μl DIX και 18 μl αιμοπεταλίων, το οποίο χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία. Τα δείγματα συμπληρώνονται στον τελικό όγκο με buffer A. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA.

α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Min	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
DIX(μl)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Platelets(μl)	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-
VIIa(nm)	-	-	-	-	240	240	240	240	240	240	240	240
Buffer A(μl)	50	50	50	50	38	38	38	38	40	40	40	40

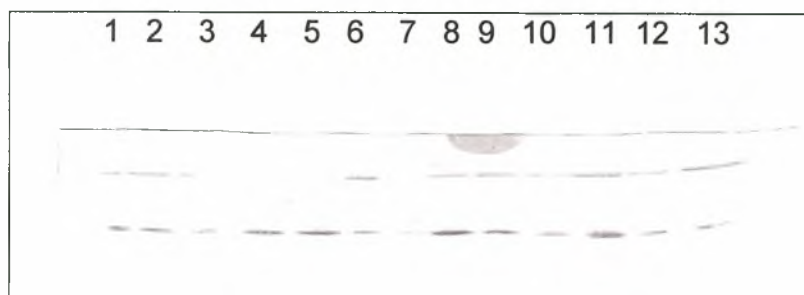


iii) Σύγκριση πλάσματος φτωχού και πλούσιου σε αιμοπετάλια στην ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου

α) Παρουσία και απουσία FVIIa σε διαφορετικούς χρόνους

Χρησιμοποιούνται 13 errendorf στα 7 πρώτα από τα οποία εισάγονται 40 μl πλάσματος PPP και στα υπόλοιπα 40 μl πλάσματος PRP. Στα δείγματα 1-3 και 8-10 προσθέτονται 240 nm VIIa. Εισάγονται 20 ml buffer A στα δείγματα 1,2,3,8,9 και 10 και από 32 ml στα δείγματα 4,5,6,7,11,12 και13. Συμπληρώνονται οι τελικοί όγκοι και η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA.

α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Min	10	20	30	10	20	30	30	10	20	30	10	20	30
PPP(μl)	40	40	40	40	40	40	40	-	-	-	-	-	-
PRP(μl)	-	-	-	-	-	-	-	40	40	40	40	40	40
VIIa(nm)	240	240	240	-	-	-	-	240	240	240	-	-	-
Buffer A(μl)	20	20	20	32	32	32	32	20	20	20	32	32	32

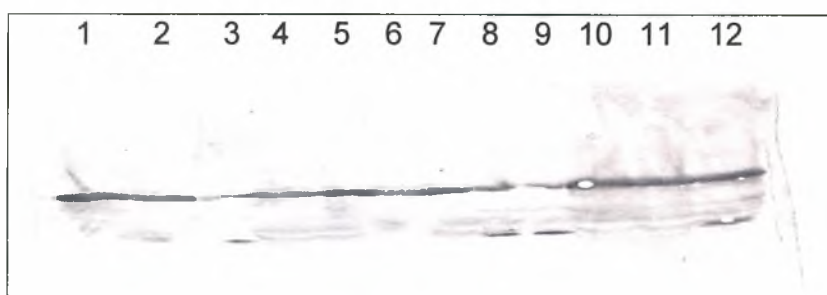


Τα δείγματα 8 και 9 είναι τα ίδια, έγινε μεταφορά από το ένα δείγμα στο άλλο κατά τη μεταφορά τους στη συσκευή για ηλεκτροφόρηση, οπότε δεν είναι ασφαλή τα συμπεράσματα από αυτά τα δείγματα.

β) Παρουσία και απουσία FVIIa σε μικρότερους διαφορετικούς χρόνους

Ακολουθεί ένα ακόμη πείραμα όμοιο με το προηγούμενο με τη διαφορά ότι οι χρόνοι αντί για 10, 20,30 λεπτά, γίνονται 2,4,7 λεπτά.

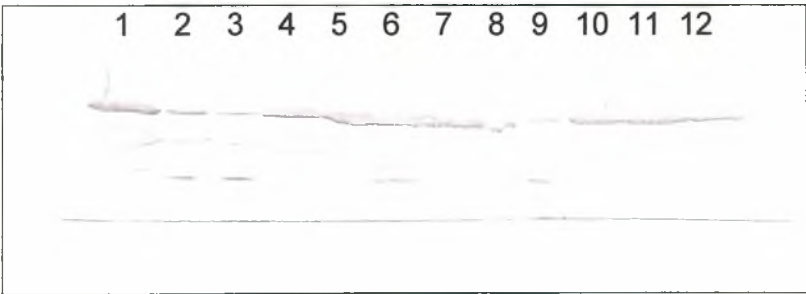
α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Min	2	4	7	2	4	7	2	4	7	2	4	7
PPP(μl)	40	40	40	40	40	40	-	-	-	-	-	-
PRP(μl)	-	-	-	-	-	-	40	40	40	40	40	40
VIIa(nm)	240	240	240	-	-	-	240	240	240	-	-	-
Buffer A(μl)	20	20	20	32	32	32	20	20	20	32	32	32



γ) Παρουσία και απουσία FVIIa σε διαφορετικές αναλογίες PPP, PRP σε διαφορετικούς χρόνους

Επιδιώκεται να διευκρινιστεί αν η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων σχετίζεται με την ταχύτητα πήξης του αίματος. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διαφορετικές ποσότητες PPP και PRP πλάσματος. Χρησιμοποιούνται 12 errendorf στα έξι πρώτα από τα οποία εισάγεται πλάσμα με αναλογία 10 μl PRP και 30 μl PPP και στα επόμενα 6 δείγματα 20 μl PRP και 20 μl PPP. Στα δείγματα 1-3 και στα δείγματα 7-9 εισάγεται παράγοντας VIIa και όλα συμπληρώνονται με buffer A στους τελικούς όγκους. Σε όλα τα δείγματα προστίθεται buffer A. Στα δείγματα 1,2,3,7,8 και 9 από 20 ml και στα 4,5,6,10,11 και 12 από 32 ml. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA.

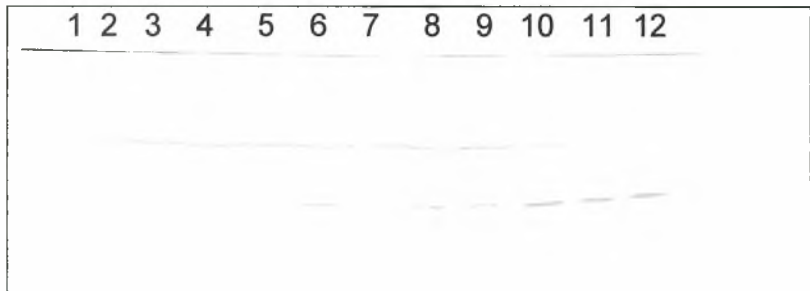
α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Min	2	4	7	2	4	7	2	4	7	2	4	7
PPP(ml)	30	30	30	30	30	30	20	20	20	20	20	20
PRP(ml)	10	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20
VIIa(nm)	240	240	240	-	-	-	240	240	240	-	-	-
Buffer A(μl)	20	20	20	32	32	32	20	20	20	32	32	32



δ) Διαφορετικές συγκεντρώσεις PPP και PRP σε διαφορετικούς χρόνους

Χρησιμοποιούνται πάλι διαφορετικές αναλογίες πλάσματος PPP και PRP. Σε όλα τα δείγματα προσθέτονται 32 ml buffer A. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl_2 (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA. Η διαφορά είναι ότι οι χρόνοι που μελετούνται στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι τα 5 τα 10 min στις αντίστοιχες αναλογίες PPP και PRP.

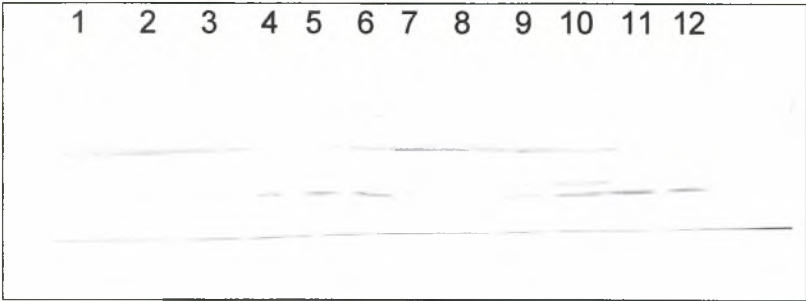
α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Min	5	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	10
PRP(μl)	0	3	7	15	25	40	0	3	7	15	25	40
PPP(μl)	40	37	33	25	15	0	40	37	33	25	15	0



ε) Κινητική PPP και PRP

Χρησιμοποιούνται 12 erpendorf, στα 6 πρώτα από τα οποία εισάγεται PPP και στα επόμενα 6 PRP. Σε όλες τις περοπτώσεις εισάγονται 32 ml buffer A. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl_2 (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA.

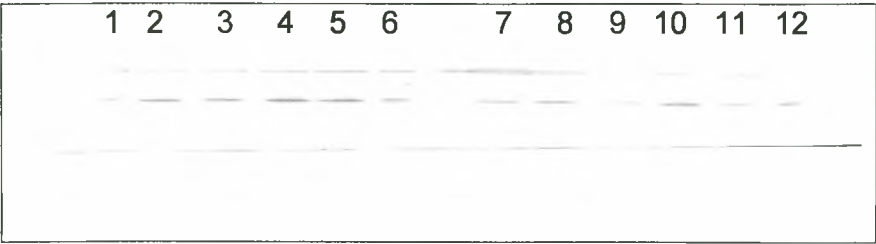
α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Min	2	5	8	12	20	35	2	5	8	12	20	35
PPP(μ l)	-	-	-	-	-	-	40	40	40	40	40	40
PRP(μ l)	40	40	40	40	40	40	-	-	-	-	-	-
Buffer A(μ l)	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32



στ) Κινητική PPP και PRP με μεγαλύτερους διαφορετικούς χρόνους

Επαναλαμβάνεται το προηγούμενο με διαφορετικούς μεγαλύτερους χρόνους.

α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Min	10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60
PPP(μ l)	40	40	40	40	40	40	-	-	-	-	-	-
PRP(μ l)	-	-	-	-	-	-	40	40	40	40	40	40
Buffer A(μ l)	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32

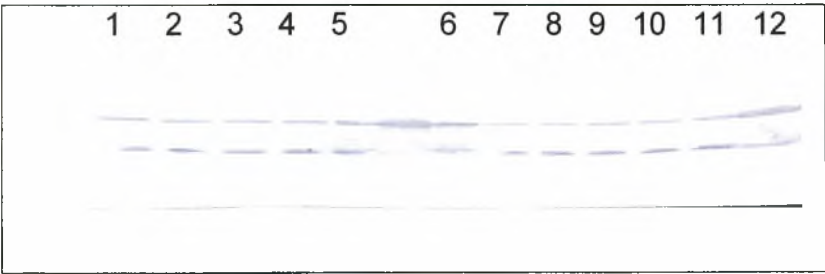


Η διαδρομή μετά τις περιπτώσεις PPP, δηλαδή μετά το 6 και πριν το 7 είναι κενή και από την επόμενη αρχίζουν οι διαδρομές για το PRP.

ζ) Διαφορετικές συγκεντρώσεις αιμοπεταλίων στον ίδιο χρόνο

Χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις αιμοπεταλίων που αντιστοιχούν στα ποσοστά 100%, 80%, 60%, 40%, 20% και 0% για τον ίδιο χρόνο των 8 min. Το ίδιο πείραμα πραγματοποιείται δύο φορές, ώστε να αποδειχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Σε όλα τα δείγματα προσθέτονται από 32 ml buffer A. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA.

α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PRP(μl)	40	32	24	16	8	0	40	32	24	16	8	0
PPP(μl)	0	8	16	24	32	40	0	8	16	24	32	40



Στη διαδρομή μετά το 5 δείγμα και πριν το 6 δεν έχει εισαχθεί δείγμα, ενδέχεται να έχει γίνει διάχυση κατά την εισαγωγή των δειγμάτων και η

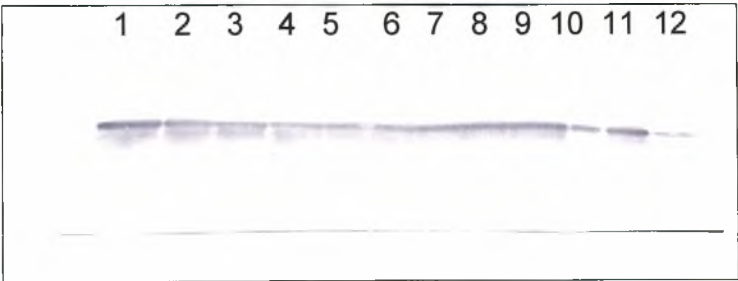
συγκεκριμένη διαδρομή δεν λαμβάνεται υπόψη στην διεξαγωγή αποτελεσμάτων.

iv) Ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου παρουσία μονοκυττάρων και παράγοντα VIIa

α) Σε PPP σε διαφορετικές ποσότητες FVIIa σε διαφορετικούς χρόνους

Σε καθένα από 12 erpendorf εισάγονται 40 μl PPP, 10 μl μονοκυττάρων, καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις VIIa. Οι ποσότητες buffer A που προστίθενται είναι αντίστοιχες του υπολοίπου για την συμπλήρωση των δειγμάτων μετά την προσθήκη FVIIa ανάλογα με την περίπτωση για να συμπληρωθούν οι τελικοί όγκοι και να είναι ίσοι μεταξύ τους. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA. Οι χρόνοι επώασης είναι τα 3 και 6 min.

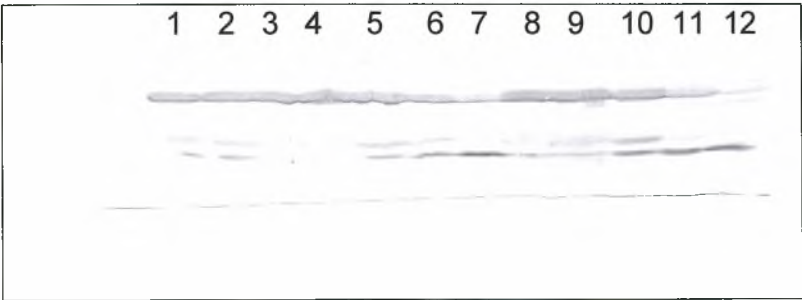
α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Min	3	6	3	6	3	6	3	6	3	6	3	6
VIIa(nm)	-	-	10	10	20	20	40	40	120	120	240	240
Buffer A(μl)	42	42	40,5	40,5	39	39	36	36	24	24	6	6



β) Σε PPP και FVIIa σε διαφορετικούς χρόνους και σε PPP και PRP σε διαφορετικούς χρόνους απουσία FVIIa

Χρησιμοποιούνται άλλα 12 erpendorf στα πρώτα 2 από τα οποία εισάγονται 40 μl PPP, 10 μl μονοκύτταρα και 120 nm VIIa. Στα erpendorf 3-7 προσθέτονται 40 μl PPP και 10 μl μονοκύτταρα, ενώ στα erpendorf 8-12 προσθέτονται 40 μl PRP και 10 μl μονοκύτταρα και συμπληρώνονται αντίστοιχα με buffer A, οπότε προκύπτει ο τελικός όγκος ίσος σε όλα τα δείγματα. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA.

α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Min	3	6	0	4	8	12	16	0	4	8	12	16
PPP(μl)	40	40	40	40	40	40	40	-	-	-	-	-
PRP(μl)	-	-	-	-	-	-	-	40	40	40	40	40
VIIa(nm)	120	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Buffer A(μl)	36	36	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42

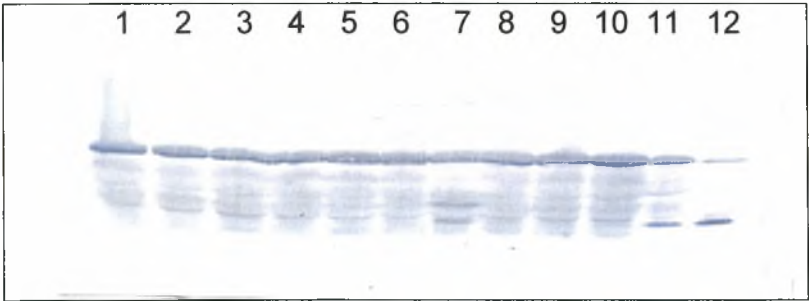


ν) Ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου παρουσία μονοκυττάρων και αντιθρομβίνης

Χρησιμοποιούνται 12 erpendorf. Στα 3 πρώτα εισάγονται 40 μl PPP και 10 μl μονοκύτταρα. Στα 2 και 3 προσθέτονται 13 μl AT και 120 nm VIIa και

συμπληρώνονται με buffer A. Στα επόμενα δείγματα γίνεται για επανάληψη μια κινητική με 40 μl PPP και 10 μl μονοκύτταρα στο κάθε erpendorf. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA.

α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Min	0	3	6	1	2	3	5	6	8	10	15	30
AT(μl)	-	13	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vlla(nm)	-	120	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Buffer A (μl)	42	24	24	42	42	42	42	42	42	42	42	42

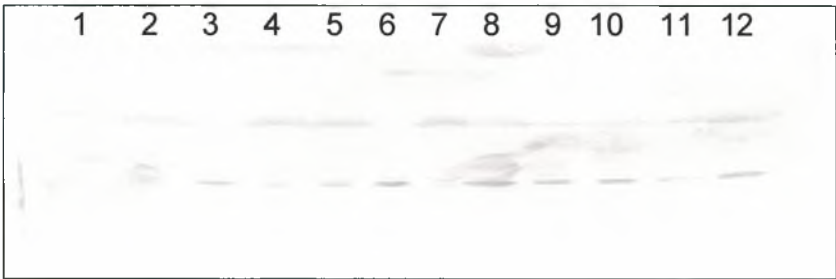


vi) Επίδραση της μαστίχας Χίου στην ενεργοποίηση του δρόμου του ιστικού παράγοντα σε PPP

Στο συγκεκριμένο πείραμα γίνεται μια απόπειρα να ελεγχθεί εάν η μαστίχα Χίου μπορεί να επιδράσει ευεργετικά στην πήξη του αίματος. Η παραπάνω υπόθεση στηρίζεται στο γεγονός ότι η μαστίχα Χίου έχει ευεργετική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού ενισχύοντάς το. Σε 12 erpendorf εισάγονται από 40 μl PPP. Στα 6 πρώτα προσθέτονται από 30 μl εκχυλισμάτων μαστίχας που έχουν δεχθεί προηγουμένως κατάλληλη επεξεργασία στο εργαστήριο Βιοχημείας και

χρησιμοποιούνται όπως ακριβώς δόθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Προστίθεται buffer A στο κάθε δείγμα και συμπληρώνονται οι τελικοί όγκοι. Η αντίδραση αρχίζει με την εισαγωγή 8 μl CaCl₂ (sph, 100Mm) και σταματά με την προσθήκη 40 μl EDTA.

α/α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Χρόνος (min)	2	5	8	12	20	35	2	5	8	12	20	35
Δείγμα(μl)	30	30	30	30	30	30	-	-	-	-	-	-
Buffer A(μl)	22	22	22	22	22	22	52	52	52	52	52	52



Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η επιδίωξη όλων των παραπάνω πειραμάτων είναι να βελτιστοποιηθεί το σύστημα in vitro με την χρήση όσο το δυνατό περισσότερων φυσιολογικών πηγών. Χρησιμοποιούνται απομονωμένα αιμοπετάλια ως το φυσικό περιβάλλον παραγωγής θρομβίνης, διότι τα αιμοπετάλια περιέχουν εκτός από φωσφολιπίδια της μεμβράνης και υποδοχείς για τους παράγοντες πήξης. Επίσης γίνεται και προσπάθεια αντικατάστασης του ιστικού παράγοντα με μονοκύτταρα (U 937) τα οποία είναι γνωστό ότι εκλύουν ιστικό παράγοντα με θετικά αποτελέσματα.

Πριν τον σχολιασμό των πειραματικών διαδικασιών αναλυτικά αξίζει να αναφερθεί συνοπτικά η δράση του FVIIa στο στάδιο παραγωγής της θρομβίνης. Έτσι, με την περίσσεια του FVIIa, πετυχαίνεται περαιτέρω

ενεργοποίηση του FVIIa από τον FXa και δεν χρειάζεται να γίνει η μετατροπή FVII σε FVIIa για να εξασφαλιστεί η απαιτούμενη ποσότητα FVIIa. Αυτό το γεγονός εξασφαλίζει χρόνο και περισσότερη διαθέσιμη θρομβίνη στο σύστημα. Άλλωστε η παρουσία του FVIIa οδηγεί στην ενεργοποίηση του FXa, στην ενεργοποίηση του FVa από τον FXa και την περαιτέρω ενεργοποίηση του FVIIa από τον FXa.

i) Κινητική της ενεργοποίησης του δρόμου του ιστικού παράγοντα (TF) από PPP σε διαφορετικούς χρόνους

Από την πρώτη ομάδα πειραμάτων (i) μελετάται ένα σύστημα όπου διατίθεται πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP) και κανέναν επιπλέον παράγοντα πήξης. Αποδεικνύεται ότι ο σχηματισμός της θρομβίνης στην περίπτωση αυτή απαιτεί ένα χρονικό διάστημα που ξεπερνά την μισή ώρα και είναι μίας ώρας περίπου. Το διάστημα αυτό είναι αρκετά μεγάλο και κρίσιμο και ίσως μπορεί να χαρακτηριστεί μοιραίο σε κλινικές και επείγουσες περιπτώσεις αιμορραγίας. Η παραπάνω παρατήρηση ωθεί στην ανάγκη περαιτέρω μελέτης του παράγοντα FVIIa και των μηχανισμών και μονοπατιών δράσης του, με σκοπό την δημιουργία φαρμακευτικών σκευασμάτων με ιδιότητες επιτάχυνσης της πήξης του αίματος.

ii) Επίδραση θρόμβου στην ενεργοποίηση του δρόμου του ιστικού παράγοντα (TF) απουσία του FIX (DIX)

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία (ii,α) χρησιμοποιείται πλάσμα από το οποίο απουσιάζει ο παράγοντας IX. Είναι ένα ελλιπές σύστημα που μοιάζει με την περίπτωση ατόμων που πάσχουν από αιμορροφιλία Β. Στο σύστημα όμως έχει προστεθεί θρομβοπλαστίνη. Παρατηρείται ότι στην περίπτωση αυτή απαιτείται χρόνος 10 min για τον σχηματισμό της θρομβίνης. Παρουσία FVIIa η θρομβίνη σχηματίζεται νωρίτερα, από τα 5 min ήδη, αναμενόμενο έχοντας ως βάση το προηγούμενο πείραμα. Παρουσία FVIIa μετά τα 5 λεπτά η ποσότητα της παραγόμενης θρομβίνης αυξάνεται σημαντικά και παρατηρείται ελάττωση της προθρομβίνης.

Ο χρόνος επομένως παρουσία FVIIa που απαιτείται τώρα είναι περίπου ο μισός, γεγονός αξιοσημείωτο, καθώς η συγκέντρωση του FVIIa που χρησιμοποιείται για την επίτευξη αυτού του αποτελέσματος είναι πολύ χαμηλή και επιπλέον από το σύστημα απουσιάζει ο παράγοντας IX. Η παρουσία λοιπόν του FVIIa, οδηγεί στον γρήγορο σχηματισμό θρομβίνης, ακόμη και σε συστήματα όπου απουσιάζει ο παράγοντας πήξης IX. Αλλά και η θρομβοπλαστίνη φαίνεται να έχει σημαντική θέση σε αυτό το αποτέλεσμα, αφού στο προηγούμενο πείραμα από το οποίο δεν απουσιάζει ο FIXa, (οι συνθήκες πιο ευνοϊκές για την παραγωγή θρομβίνης) απαιτείται χρόνος μεγαλύτερος από μισή ώρα. Η θρομβοπλαστίνη επομένως και ο FVIIa ευνοούν την παραγωγή θρομβίνης.

Παράλληλα (ii, β), διαπιστώνεται ότι σε ένα παρόμοιο σύστημα όπου απουσιάζει ο παράγοντας πήξης IX, η παρουσία της θρομβοπλαστίνης (TP) ευνοεί τον σχηματισμό θρομβίνης. Στα συγκεκριμένα δείγματα ακόμη και μετά από 30 min, δεν παρατηρείται θρομβίνη. Η παρουσία της θρομβοπλαστίνης είναι ακόμη πιο αποτελεσματική και από την περίπτωση παρουσίας του FVIIa στο σύστημα απουσία θρομβοπλαστίνης. Όταν υπάρχει μόνο θρομβοπλαστίνη παρατηρείται η παραγωγή θρομβίνης μετά από 20 min, ενώ στον ίδιο χρόνο και στο ίδιο σύστημα η παρουσία του FVIIa αδυνατεί να οδηγήσει στη δημιουργία της θρομβίνης. Ο βέλτιστος συνδυασμός σε αυτό το ελλιπές σύστημα είναι η συνύπαρξη τόσο θρομβοπλαστίνης, όσο και FVIIa. Τότε ο χρόνος σχηματισμού της θρομβίνης είναι μόλις 10 min και μάλιστα η ποσότητα της παραγόμενης θρομβίνης είναι μεγαλύτερη από αυτή που παράγεται όταν στο σύστημα δρα μόνο η θρομβοπλαστίνη.

Στο ίδιο πείραμα διαπιστώνεται ότι σε ένα σύστημα όπου απουσιάζει ο παράγοντας IX, εάν δεν προστεθεί κάποιος άλλος παράγοντας, συγκεκριμένα ο FVIIa, απαιτείται χρόνος μεγαλύτερος από 30 min για να δημιουργηθεί θρομβίνη. Επομένως η απουσία του FIX αναστέλλει τον χρόνο και περιορίζει την ποσότητα παραγόμενης θρομβίνης.

Ακόμη, σε παρόμοιο σύστημα (ii, γ) όπου απουσιάζει ο παράγοντας IX σε συνθήκες απουσίας θρομβοπλαστίνης και παρουσίας FVIIa, η θρομβίνη αρχίζει να σχηματίζεται στα 20 min, ενώ στην περίπτωση που υπάρχει τόσο θρομβοπλαστίνη, όσο και FVIIa, ο χρόνος εμφάνισης της θρομβίνης είναι τα 10 min, δηλαδή περίπου ο μισός. Τα γεγονότα αποδεικνύουν την

σημαντικότητα όχι μόνο του FVIIa, αλλά και της θρομβοπλαστίνης στην ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου. Μάλιστα ίσως η θρομβοπλαστίνη είναι αυτή που ωθεί στην πιο γρήγορη εμφάνιση της θρομβίνης σε σχέση με τον χρόνο που απαιτείται για τη δημιουργία της με την παρουσία του FVIIa.

Επιπλέον, όταν στο σύστημα (ii, δ) με πλάσμα αίματος από το οποίο απουσιάζει ο FIX προστίθενται αιμοπετάλια, τότε αποδεικνύεται ότι επιταχύνεται η παραγωγή της θρομβίνης. Δηλαδή, σε σύστημα παρουσία επιπλέον αιμοπεταλίων σε χρόνο 10 λεπτών δημιουργείται θρομβίνη. Φαίνεται ότι τα επιπλέον αιμοπετάλια επιδρούν στο σύστημα επιταχύνοντας την παραγωγή της θρομβίνης. Όταν στο σύστημα με τα επιπλέον αιμοπετάλια προστεθεί και FVIIa, τότε παρατηρείται και πάλι θρομβίνη από τα 10 πρώτα λεπτά, αλλά η ποσότητά της φαίνεται ότι είναι μεγαλύτερη. Μοιάζει να υπάρχει μία συνεργική δράση των αιμοπεταλίων και του παράγοντα FVIIa ως προς την ποσότητα της δημιουργούμενης θρομβίνης. Ακόμη και όταν από το σύστημα απουσιάζει η επιπλέον ποσότητα των αιμοπεταλίων και δρα ο FVIIa, παράγεται θρομβίνη και πάλι από τα 10 λεπτά και σε ποσότητα που μοιάζει με αυτή που υπάρχει όταν στο σύστημα δρουν και ο FVIIa και τα αιμοπετάλια.

iii) Σύγκριση πλάσματος φτωχού και πλούσιου σε αιμοπετάλια στην ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου

Στην ομάδα πειραμάτων που ακολουθεί γίνεται σύγκριση πλάσματος φυσιολογικού, αλλά φτωχού σε αιμοπετάλια (PPP) και πλάσματος φυσιολογικού και πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP) παρουσία και απουσία του FVIIa. Σε χρόνους μεγαλύτερους από τα 10 min (iii, α) δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στην ποσότητα και στον χρόνο της παραγόμενης θρομβίνης. Δηλαδή τόσο η παρουσία του FVIIa, όσο και η απουσία του δίνουν παρόμοια αποτελέσματα παρουσίας θρομβίνης, τόσο σε αίμα φτωχό όσο και σε αίμα πλούσιο σε αιμοπετάλια. Η διαπίστωση αυτή ωθεί στη σκέψη ότι πριν τα 10 πρώτα min είναι το κρίσιμο σημείο που πρωτοεμφανίζεται η θρομβίνη και ίσως υπάρχουν διαφορές στα συστήματα.

Έτσι στην επόμενη πειραματική διαδικασία (iii, β) που χρησιμοποιούνται μικρότεροι χρόνοι τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια απουσία του FVIIa μέχρι τα 7 min δεν σχηματίζεται θρομβίνη,

ενώ σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια στα 7 min έχει σχηματιστεί θρομβίνη απουσία του FVIIa. Επομένως η παρουσία μεγαλύτερης ποσότητας αιμοπεταλίων βοηθά την θρομβίνη να εμφανιστεί πιο γρήγορα σε περιπτώσεις όμως που δεν απουσιάζουν παράγοντες πήξης από το σύστημα και θεωρείται φυσιολογικό. Αλλά και όταν στα ίδια συστήματα προστίθεται FVIIa μπορεί να γίνει ορατό ότι στην περίπτωση του πλάσματος που είναι πλούσιο σε αιμοπετάλια παράγεται πιο γρήγορα θρομβίνη, μόλις από τα πρώτα 4 min. Σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια ο χρόνος που απαιτείται είναι 7 min περίπου. Επομένως, σε πλάσμα φυσιολογικό και πλούσιο σε αιμοπετάλια είναι αξιοσημείωτο το προβάδισμα στο χρόνο παραγωγής της θρομβίνης σε σχέση με το πλάσμα που είναι φτωχό σε αιμοπετάλια. Έτσι τα αιμοπετάλια αποδεικνύονται σημαντικό όπλο στον μηχανισμό πήξης.

Στο επόμενο πείραμα (iii, γ) που χρησιμοποιούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις αιμοπεταλίων είναι φανερό πάλι ότι η παρουσία του FVIIa πετυχαίνει την πιο γρήγορη παραγωγή θρομβίνης σε κάθε περίπτωση είτε υπάρχουν λίγα είτε υπάρχουν πολλά αιμοπετάλια στο σύστημα. Εκτός όμως από αυτό, όταν ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι μικρότερος, τότε παρατηρείται ότι παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα θρομβίνης στα 7 min παρουσία και απουσία του FVIIa. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παρουσία των επιπλέον αιμοπεταλίων ίσως είναι ανασταλτικός παράγοντας στην ποσότητα της παραγόμενης θρομβίνης.

Στη συνέχεια (iii,δ) με περισσότερες διαφορετικές συγκεντρώσεις αιμοπεταλίων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων, ενισχύεται η ποσότητα της παραγόμενης θρομβίνης για τον χρόνο επώασης 5 min. Για τον χρόνο 10 min ισχύει και πάλι το ίδιο, δηλαδή αυξάνεται η ποσότητα της παραγόμενης θρομβίνης, όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων. Θα πρέπει επομένως να υπάρχει μια βέλτιστη συγκέντρωση αιμοπεταλίων στο πλάσμα. Αυτή είναι η ιδανική για την επιτυχία της πήξης. Μικρότερος αριθμός αιμοπεταλίων έχει μεν επίδραση δεν είναι όμως αυτή η μέγιστη δυνατή που πετυχαίνεται με την βέλτιστη συγκέντρωση που προαναφέρθηκε. Από την άλλη πλευρά, συγκέντρωση αιμοπεταλίων πάνω από τις τιμές που παρατηρείται το βέλτιστο αποτέλεσμα δεν έχει παραπέρα δράση στην πήξη και η ποσότητα της παραγόμενης

θρομβίνης από το σημείο της βέλτιστης συγκέντρωσης αιμοπεταλίων και μετά παραμένει σταθερή.

Ακολούθως παρατηρώντας τα αποτελέσματα από το πείραμα (iii,ε) διαπιστώνεται ότι σε περιπτώσεις πλάσματος φυσιολογικού, αλλά φτωχού σε αιμοπετάλια, χωρίς την προσθήκη παράγοντα VIIa, η θρομβίνη αρχίζει να παράγεται μετά από 8 min περίπου. Αλλά και σε πλάσμα φυσιολογικό και πλούσιο σε αιμοπετάλια είναι εφικτή η παραγωγή θρομβίνης περίπου στα 8 min, στον ίδιο δηλαδή περίπου χρόνο. Η παρουσία των αιμοπεταλίων συμπεραίνεται λοιπόν δεν οδηγεί σε μεγάλη διαφορά στον χρόνο παραγωγής της θρομβίνης που είναι περίπου τα 8 λεπτά.

Όπως φαίνεται από το επόμενο πείραμα (iii,στ), όταν ο αριθμός των αιμοπεταλίων στο πλάσμα είναι μικρός και χρησιμοποιούνται μεγάλοι χρόνοι, παράγεται μεγάλη ποσότητα θρομβίνης από τα 10 λεπτά. Παρόμοιο συμπέρασμα προκύπτει και όταν το πλάσμα είναι πλούσιο σε αιμοπετάλια.

Στη συνέχεια (iii,ζ) διαπιστώνεται ότι ο μικρός αριθμός αιμοπεταλίων αντιστοιχεί στην μικρή ποσότητα παραγόμενης θρομβίνης στο χρόνο 8 min. Έτσι η παρουσία των αιμοπεταλίων στο σύστημα φαίνεται ότι συντελεί στην αύξηση της παραγόμενης ποσότητας θρομβίνης στον κρίσιμο χρόνο των 8 min, όπου αυτή αρχίζει να πρωτοεμφανίζεται.

iv) Ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου παρουσία μονοκυττάρων και παράγοντα VIIa

Στην επόμενη ομάδα πειραμάτων προσθέτονται και μονοκύτταρα σε πλάσμα φυσιολογικό, αλλά φτωχό σε αιμοπετάλια παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του FVIIa και απουσία αυτού. Απουσία του FVIIa (iv,α) δεν έχει ακόμη σχηματιστεί θρομβίνη. Παράλληλα με την παρουσία 10 nm FVIIa στο σύστημα ακόμη και μετά από 6 min δεν είναι δυνατή η παραγωγή θρομβίνης. Η ποσότητα της θρομβίνης αυξάνεται και φαίνεται ότι στη συγκέντρωση FVIIa 120 nm στα 3 min αρχίζει να παράγεται η θρομβίνη (στα 18 μl) .

Σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια, αλλά φυσιολογικό και παρουσία μονοκυττάρων, (iv, β) για την παραγωγή της θρομβίνης απαιτείται χρόνος 8 min. Αντίθετα, σε πλάσμα φυσιολογικό και πλούσιο σε αιμοπετάλια ήδη πριν

από τα 4 min αρχίζει να σχηματίζεται η θρομβίνη. Σε σύγκριση με προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες που δεν χρησιμοποιούνται καθόλου μονοκύτταρα, διαπιστώνεται ότι η παρουσία των μονοκυττάρων συμβάλλει στη διαδικασία της πήξης αυξάνοντας την ποσότητα της παραγόμενης θρομβίνης, αφού εκλύουν ιστικό παράγοντα. Το συμπέρασμα μπορεί να προκύψει από συγκεκριμένη παρατήρηση στο πείραμα (iii ε) που έχει γίνει στις ίδιες συνθήκες με το iv β. Επομένως δεν είναι μόνο η παρουσία των αιμοπεταλίων που μετέχει στο σύστημα, αλλά και η παρουσία των μονοκυττάρων έχει ενεργό ρόλο στο γρηγορότερο σχηματισμό της θρομβίνης.

v) Ενεργοποίηση του ιστικού δρόμου παρουσία μονοκυττάρων και αντιθρομβίνης

Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται ο αναστολέας της πήξης αντιθρομβίνη (AT). Παρατηρείται η δράση του αναστολέα στο σύστημα. Ακόμη και όταν υπάρχει παράγοντας VIIa 120 nm που σε προηγούμενα πειράματα εξασφάλιζε την παραγωγή θρομβίνης, στα 6 min δεν έχει προλάβει να σχηματιστεί θρομβίνη. Υπάρχει αναστολή στο σχηματισμό της θρομβίνης.

Στην ίδια πειραματική διαδικασία διαπιστώνεται ότι σε ένα σύστημα φτωχό σε αιμοπετάλια, αλλά φυσιολογικό, απαιτείται χρόνος 15 min παρουσία μονοκυττάρων για την εμφάνιση θρομβίνης.

vi) Επίδραση της μαστίχας Χίου στην ενεργοποίηση του δρόμου του ιστικού παράγοντα σε PPP

Στο πείραμα (vi) που χρησιμοποιείται εκχύλισμα μαστίχας Χίου και πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, δε φαίνεται κάποια σημαντική επίδραση της στην οδό πήξης του αίματος. Τα αποτελέσματα τόσο με την παρουσία του δείγματος, όσο και χωρίς αυτό είναι παρόμοια και δεν φαίνεται κάποια αξιοσημείωτη διαφορά τόσο στο χρόνο, όσο και στην ποσότητα της παραγόμενης θρομβίνης. Έτσι και στις δύο περιπτώσεις μετά τα πρώτα 5 λεπτά αρχίζει η παραγωγή θρομβίνης.

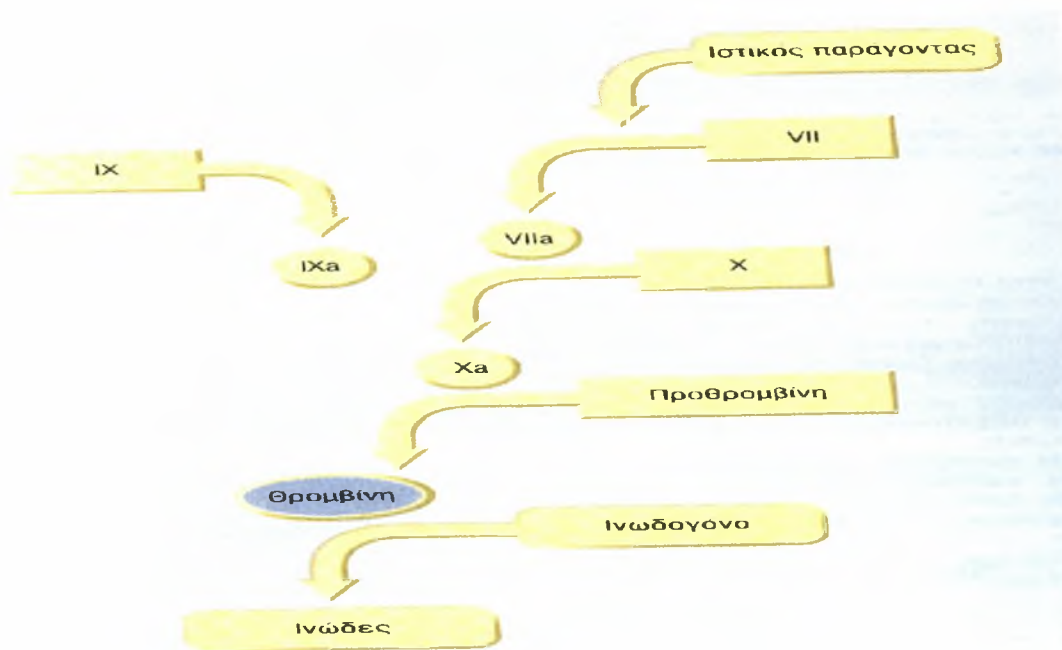
Δ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η τεχνική Western Blot που εφαρμόζεται παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Είναι μια απλή μέθοδος, τα αποτελέσματα της οποίας είναι συγκρίσιμα με τις ήδη υπάρχουσες εξειδικευμένες τεχνικές, όπως είναι η δοκιμασία εμφάνισης θρομβίνης (Thrombin generation test) σε PPP που εφαρμόζεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια και η θρομβοελαστογραφία (Thromboelastography) με την οποία μελετάται η ποιότητα του θρόμβου. Παράλληλα, είναι μια ημιποσοτική μέθοδος, αλλά μπορεί να γίνεται και ποσοτική με τη χρήση scanner και ειδικού προγράμματος και να καθιστά τα gel συγκρίσιμα. Επιτρέπει τη μελέτη της κινητικής μετατροπής της προθρομβίνης σε θρομβίνη καθώς και των άλλων παραγόντων της πήξης. Έτσι, βρίσκεται κατά πόσο η παρουσία ή η απουσία διαφόρων παραγόντων, τροποποιητών, αλλά και φαρμάκων μπορεί να επηρεάζει το μηχανισμό της πήξης του αίματος. Με την τεχνική ακόμη μπορεί να υπολογιστεί *ex vivo*, *in vitro* η δράση των παραγόντων και να επιτραπεί η επεξεργασία του ολικού αίματος που είναι το πλέον φυσιολογικό σύστημα και μπορεί να επεκταθεί και να χρησιμοποιηθεί στην έρευνα καινούριων φαρμάκων.

Συνοπτικά, από όλα τα παραπάνω πειράματα πάνω στο μηχανισμό της πήξης με τη συγκεκριμένη μέθοδο προκύπτει το συμπέρασμα ότι η προσθήκη του παράγοντα VIIa σε περίσσεια καταφέρει να εξασφαλίζει πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερη ποσότητα θρομβίνη, επιβεβαιώνοντας όσα ισχύουν από τη βιβλιογραφία και αποτελώντας ένα σημαντικό βοήθημα στην έρευνα στον τομέα της αιμόστασης.

Τα αιμοπετάλια και ο παράγοντας VIIa αποτελούν σημαντικούς συνεργάτες. Με άλλα λόγια, η παρουσία των αιμοπεταλίων και του VIIa σε συστήματα μελέτης εξασφαλίζουν την πιο γρήγορη παραγωγή θρομβίνης επεμβαίνοντας στην πορεία της πήξης του αίματος όπως φαίνεται και στο σχεδιάγραμμα 1.

Όταν χρησιμοποιείται φυσιολογικό πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια η θρομβίνη εμφανίζεται γενικά νωρίτερα, καθώς υπάρχουν περισσότερα διαθέσιμα αιμοπετάλια.



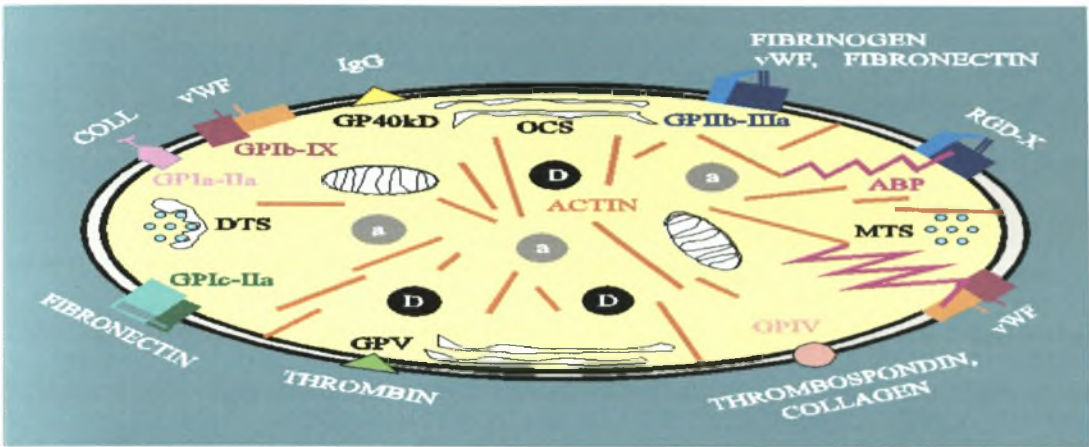
σχεδιάγραμμα 1: η διαδικασία της πήξης

Σε αντίθεση με όλες τις πειραματικές διαδικασίες και με τη βιβλιογραφία που οδηγούν στο παραπάνω συμπέρασμα υπάρχει και μία (iii γ) που έρχεται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, παρουσιάζοντας την αυξημένη ποσότητα αιμοπεταλίων ως ανασταλτικό παράγοντα στον μηχανισμό της πήξης. Ίσως στην συγκεκριμένη περίπτωση να υπήρξε κάποιος εξωγενής παράγοντας που να αλλοίωσε τα αποτελέσματα.

Η ποσότητα θρομβίνης που παράγεται τελικά συνολικά σε κάθε περίπτωση είναι η ίδια, τόσο στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται PPP (φτωχό σε αιμοπετάλια), όσο και στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται PRP (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια). Η ποσότητα δηλαδή των αιμοπεταλίων επιταχύνει την εμφάνιση θρομβίνης, αλλά ίσως δεν επιδρά στο τελικό ποσό παραγόμενης θρομβίνης.

Ο παράγοντας VIIa, παρουσία φυσιολογικού PPP απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την παραγωγή θρομβίνης, από ότι για την παραγωγή θρομβίνης με πλάσμα PRP. Άλλωστε και απουσία του FVIIa το πλάσμα PPP απαιτεί περισσότερο χρόνο για την πήξη του αίματος σε σχέση με το πλάσμα PRP. Με PRP η παραγωγή της θρομβίνης παρατηρείται νωρίτερα, αλλά η τελική ποσότητα που παράγεται και στις δύο περιπτώσεις είναι η ίδια! Παράγεται λοιπόν η ίδια τελική ποσότητα θρομβίνης με τη διαφορά ότι όταν τα

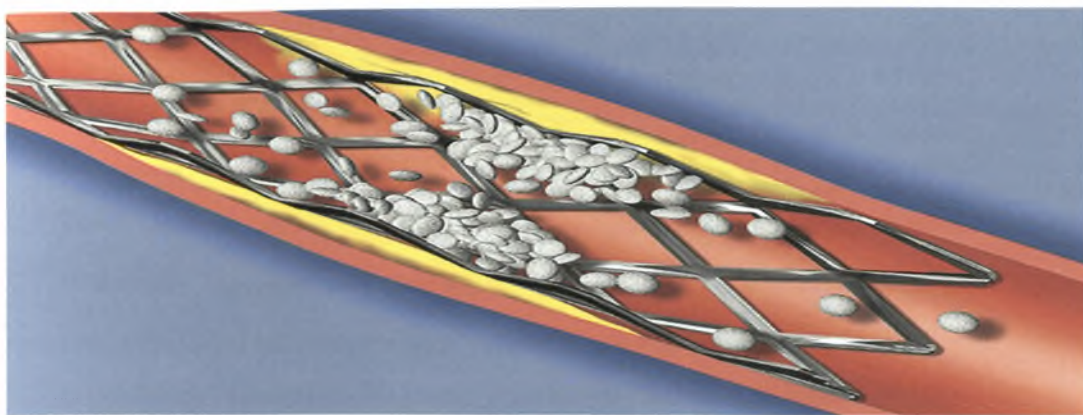
αιμοπετάλια (εικόνα 15) είναι περισσότερα (περίπτωση PRP) η εμφάνιση της θρομβίνης είναι πιο γρήγορη.



εικόνα 15: αιμοπετάλιο

Μία εξήγηση του παραπάνω είναι ότι όταν είναι λίγα τα αιμοπετάλια, πρέπει να περάσει κάποιος χρόνος, για να ελευθερωθούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή θρομβίνης. Όσο πιο πολλά είναι τα διαθέσιμα αιμοπετάλια, τόσο πιο γρήγορα πραγματοποιούν το ρόλο τους και δεν χρειάζεται να περάσει πολύ χρόνος για να ελευθερωθούν. Εξασφαλίζεται λοιπόν χρόνος και παρατηρείται πιο γρήγορα η δημιουργία της θρομβίνης. Τελικά ανεξάρτητα από τη διαθέσιμη ποσότητα των αιμοπεταλίων, η ποσότητα της θρομβίνης που παράγεται είναι η ίδια. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως υπάρχει μια βέλτιστη συγκέντρωση αιμοπεταλίων που απαιτείται για την ολοκλήρωση του ρόλου τους στον μηχανισμό της πήξης που αφορά την προσκόλληση τους, τη συσσώρευσή τους (εικόνα 15) και την παραγωγή θρομβίνης. Πέρα από αυτήν την συγκέντρωση η παραγωγή της θρομβίνης παραμένει σταθερή.

Η θρομβοπλαστίνη (TP) που βρίσκεται σε κάθε σημείο μικρού ή μεγάλου τραυματισμού φαίνεται ότι ευνοεί τον μηχανισμό της πήξης του συστήματος, όπως άλλωστε είναι αναμενόμενο, αφού αποτελεί σημαντικό και ουσιαστικό παράγοντα εκκίνησης του μηχανισμού της πήξης του αίματος. Σε κάθε περίπτωση η παρουσία θρομβοπλαστίνης επιφέρει γρήγορη παραγωγή θρομβίνης.



εικόνα 15: προσκόλληση και συσσώρευση αιμοπεταλίων

Η παρουσία της αντιθρομβίνης, όπως αναμένεται με βάση τη βιβλιογραφία, δρα ανασταλτικά περιορίζοντας την ποσότητα της παραγωγή της παραγόμενης θρομβίνης και καθυστερώντας την δημιουργία της. Αντίθετα επιβεβαιώνεται ότι τα μονοκύτταρα αποτελούν σημαντικό ενεργοποιητή της πορείας του μηχανισμού της πήξης και συνεργάτη των αιμοπεταλίων στον μηχανισμό, ενώ φαίνεται ότι η μαστίχα της Χίου δεν έχει σημαντική επίδραση στο μηχανισμό της πήξης.

Ε) ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σύνθετη διαδικασία της πήξης έχουν ξεχωριστό ρόλο τα αιμοπετάλια, η αντιθρομβίνη και οι παράγοντες πήξης του αίματος. Μελετούνται οι παράγοντες VIIa, IXa και η θρομβοπλασίνη και η δράση των αιμοπεταλίων και της αντιθρομβίνης, καθώς και των μονοκυττάρων και του εκχυλίσματος μαστίχας Χίου. Ο παράγοντας VIIa πετυχαίνει τη διακοπή της αιμορραγίας χωρίς να παρατηρούνται θρομβώσεις. Σε περιπτώσεις απουσίας του παράγοντα IXa προκύπτει ένα ελλιπές σύστημα που αποδεικνύει τη σημαντικότητα του συγκεκριμένου παράγοντα. Η θρομβοπλασίνη, τα αιμοπετάλια και τα μονοκύτταρα αποτελούν ενεργοποιητές και συνεργάτες στο μηχανισμό της πήξης. Η παρουσία της αντιθρομβίνης εκδηλώνει ανασταλτική δράση στο σύστημα, ενώ το εκχύλισμα μαστίχας Χίου δεν έχει καμία επίδραση σε αυτό.

ΣΤ) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μακρήs Π., «Αιμόσταση», 2001.
2. Gerotziafas G.T., Elalamy I., Depasse F., Chakroun T., Bara L., Arzoglou P. and Samama M.M., «On the mechanism of inhibition of tissue factor pathway by the synthetic pentasaccharide during coagulation of human plasma», *Blood coagulation and fibrolysis* (2003), **14**:633-638.
3. Monroe D.M., Hoffman M. and Roberts H.R., «Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis», *Hemostasis and Thrombosis* (2001), **Part X, Chapter 112**, 1409-1429.
4. Butenas S., Brummel K. E., Bouchard B.A. and Mann K.G., «How factor VIIa works in hemophilia», *Journal of thrombosis and Haemostasis* (2003), **1**:1158-1160.
5. Ruf W., Dorfleutner A. and Riewald M., «Specificity of coagulation factor signaling», *Journal of thrombosis and Haemostasis* (2003), **1**:1495-1503.
6. Page, Curtis, Sutter, Walker and Hoffman, *Φαρμακολογία* (2000), **vol 9**: 197-214. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης.
7. Μπέης Ιs., Γαιτανάκη Α., Καλογιάννη Μ., Λάζου Α. και Παπαδόπουλος Α., «Αρχές Φυσιολογίας», Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη (2000), p 231-247.
8. Gerotziafas G. T., Bara L., Bloch M.F., Makris P.E. and Samama M.M., «Comparative effects of synthetic pentasaccharide, low molecular weight heparin, unfractionated heparin and recombinant hirudin on the generation of factor VIIa and prothrombin activation after coagulation of human Plasma», *Blood coagulation and fibrolysis* (1998), **9**:571-580.
9. Laemmli, U.K (1970) *Nature* **227**:680-685.
10. Giesen P.L.A., Rauch U., Bohrman B., Kling D., Roque M., Fallon J., Bodimon J., Himper J., Riederer M. and Nemerson Y., «Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis»,

Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1999) **96**:2311-2315.

11. Weitz J.I., «Heparin sulfate: Antithrombotic or not?», *The Journal of Clinival Investigation* (2003), **111**:952-955.
12. Vincenot A. and Gaussem P., «Physiologie et regulation cellulaire du systeme de la proteine C», *Ann.Biol.Clin.* **vol 55** (1997) 17-20.
13. Gerotziafas G. T., Chakroun T., Derasse F., Arzoglou P., Samama M.M. and Elalamy I., «The role of platelets and recombinant factor VIIa on thrombin generation, platelet activation and clot formation» , *Thrombosis Haemostasis* (2004), **91**:977-985.
14. Ansani N.T., «PharmD Fondaparinux: The First Pentasaccharide Anticoagulant» *P&T.* (2002), **27(6)**:310-315.
15. Gerotziafas G. T., «Generation du FVIIa pendant la coagulation du plasma humain» , *διδακτορικό*, Παρίσι 1999.
16. Gerotziafas G. T., Zervas K., Arzoglou P., Karavaggeli E., Parasxou S., Van Dreden P., Christakis J. and Samama M.M., «On the mechanism of action of recombinant activated factor VII administered to patients with severe thrombocytopenia and lifethreatening haemorrhage: focus on prothrombin activation». *Br.J.Haematol.* (2002 Jun); **117(3)**:705-8.
17. Monroe D.M., Hoffman M. and Roberts H.R., «Platelets and thrombin generation», *Thrombosis and Hemostasis* (2002); **22**:1381-1389.